UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

Année 1962 N° 60

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

par

Guy VINCENDON

né à Régny (Loire) le 13 juin 1936

Lauréat de la Faculté de Médecine

Licencié ès-sciences

Assistant à l'Institut de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine

---

Contribution à l'étude des phosphorylations oxydatives du cerveau d'homeothermes et d'hibernants

---

Président : M. P. MANDEL, Professeur

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG – FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

Année 1962 N° 60

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

par

Guy VINCENDON

né à Régny (Loire) le 13 juin 1936

Lauréat de la Faculté de Médecine

Licencié ès-sciences

Assistant à l'Institut de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine

---

Contribution à l'étude des phosphorylations oxydatives du cerveau d'homeothermes et d'hibernants

---

Président : M. P. MANDEL, Professeur

FACULTÉ DE MÉDECINE DE STRASBOURG

MM.	FONTAINE	Doyen
	CALLOT	Doyen honoraire
	CALLOT	Assesseur

Professeurs titulaires

MM.	MEYER	Anatomie
	FRUHLING	Anatomie Pathologique
	KLEIN	Biologie Médicale
	MANDEL	Chimie Biologique
	CLAVERT	Embryologie
	ARON M.	Histologie
	ARON Cl.	Histologie
	WAITZ	Hématologie
	TUSLANE	Hygiène et Bactériologie
	CHAUMONT	Médecine Légale et Médecine Sociale
	CALLOT	Parasotologie et Médecine tropicale
	SCHMID	Pharmacologie et Médecine expérimentale
	KAYSER	Physiologie
	METZ	Physiologie Appliquée
	CHEVALLIER	Physique Biologique
	FONTAINE	Clinique Chirurgicale A
	WEISS	Clinique Chirurgicale B
MM.	WARTER	Clinique Médicale A
	STAHL	Clinique Médicale B
	WORINGER	Clinique Dermatologique
	SACREZ	Clinique de Pédiatrie et Puériculture
	THIEBAUT	Clinique Neurologique
	ROHMER Fr.	Neurologie
	BURGER	Clinique Gynécologique et d'accouchement
	NORDMANN	Clinique Ophtalmologique
	GREINER	Clinique Oto-Rhino-Laryngologique
	OUDET	Chaire de Clin. et de Prophylaxie de la Tuberculose
	KAMMERER	Clinique Psychiatrique
	JUNG	Pathologie chirurgicale
	METZGER	Claire de Thérapeutique
	GROS	Chaire d'Electro-Radiologie
	STEPHAN	Pathologie Expérimentale
	VEDRINE	Stomatologie

Professeurs sans chaire

MM.	MARX	Physiologie
	WINCKLER	Anatomie
	LE GAL	Anatomie Pathologique
MM.	MINCK	Hygiène et Bactériologie
	MARESCAUX	Histologie
	MAYER G.	Hématologie

Maitres de Conférences Agrégés

MM. BATZENSCHLAGER
CHAMBON
CHAMBRON
KARLI
KIRN
KORITKE
LAVILLAUTREIX
SCHNEIDER
VERMEIL
WEILL J.D.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Agrégés

MM. BOCKEL
BOLLACK
BRONNER
BURGHARD
CHAMPY
DORNER
FRANK
GANDAR
HOLLENDER
ISRAEL
JAHN
JUIF
KIENY
KLOTZ
LEVY J.M.
MANTZ
MARCOUX
MULLER J.N.
MULLER P.
SCHWARTZ
WEILL J.P.
WITZ

Agrégés libres

MM. BUCK, FORSTER, KUHLMANN D., KUNTZMANN, VOEGTLIN, BEYER.

Directeur de l'Institut dentaire

M. VEDRINE

Chargés d'un cours d'enseignement complémentaire

MM. MEHL J., METZGER O., MUGLER A., SINGER, MATHIS, Mme MAYER S., MOISE.

Professeurs honoraires

MM. BARRE
BENOIT
KANNS
KELLER
REDSLOB
ROHMER
ROEDERER
VAUCHER
VINTEMBERGER

La faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ni les approuver, ni les improuver.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes chers condisciples, je promets et je jure au nom de l'Etre Suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs, ni à favoriser les crimes.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis resté fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

A MES PARENTS

Conscient de l'impossibilité dans laquelle je me trouve de leur rendre jamais tout ce que je leur dois, c'est d'abord à eux que je veux dédier ce travail, en modeste témoignage de ma profonde affection.

A MA FEMME

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur P. MANDEL.

Nous sommes heureux et fier d'être son élève. Sa conception éminemment vivante de la recherche a su nous confirmer dans l'orientation biochimique que nous avions choisie. Le constant renouvellement de son enthousiasme est pour nous un précieux stimulant.

La bienveillance qu'il nous témoigne s'étend bien au delà des strictes limites de notre travail scientifique.

Profondément conscient de ce que nous lui devons, nous le prions de trouver ici l'expression de notre respectueux attachement et de notre sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Ch. KAYSER.

Il nous a constamment guidé avec la plus grande bienveillance dans la partie physiologique de notre travail. Sa vaste expérience des problèmes de l'hibernation et de l'hypothermie nous a été une aide de tous les instants.

Nous le prions de croire à notre sincère et très respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Docteur J. -D. WEILL.
Maître de Conférences Agrégé

Nous bénéficions, dans la pratique quotidienne du laboratoire, de sa grande culture biochimique et de son remarquable esprit critique.

Nous lui exprimons notre vive gratitude.

A Monsieur le Docteur P. CHAMBON.
Maître de Conférences Agrégé

Les conseils amicaux et éclairés qu'il nous donne toujours volontiers nous sont précieux.

Nous serions heureux qu'il veuille bien trouver ici un témoignage de notre réelle reconnaissance.

ABREVIATIONS

AMP, ADP, ATP... Acide mono-, di-, triphosphorique
FAD ..... Flavine-adénine-dinucléotide
TPN ..... Triphosphopyridine-nucléotide
Pi ..... Phosphore inorganique
G-6-P Glucose-6-phosphate
DNP ..... Dinitrophénol
cyt c ..... Cytochrome c
E. D. T. A. ..... Ethylène-diamine-tétracétate
tris ..... Tri-hydroxy-méthyl-amino-méthane
E. C. G. ..... Electrocardiogramme
P. F. ..... Poids frais
D. O. ..... Densité optique
Q_{o_2} ..... Consommation d'oxygène par unité de poids frais et par unité de temps
g ..... Accélération due à la pesanteur
$\bar{x}$ ..... °Moyenne des valeurs expérimentales
n ..... °Nombre de valeurs expérimentales
S ..... Ecart-type
dl ..... °Nombre de degrés de liberté
dl_I ..... °Nombre de degrés de liberté à l'intérieur d'un groupe de données.
dl_E ..... °Nombre de degrés de liberté entre divers groupes de données.
F ..... °Test "F" employé soit dans l'analyse de variance soit dans l'analyse de covariance
p ..... °Probabilité pour qu'une différence soit due au hasard.
χ^2 ..... °Valeur calculée en appliquant le test de BARTLETT

°Pour toutes ces abréviations, se reporter aux paragraphes "mode d'expression des résultats" et "analyse statistique des résultats".

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué à l'Institut de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de Strasbourg sous la direction de M. le Professeur P. Mandel. Intéressé depuis de nombreuses années par les problèmes neurochimiques, il a choisi, en nous proposant notre sujet de thèse, de nous orienter vers cet aspect de la Biochimie. Nous lui devons d'en avoir découvert l'importance et l'attrait. Nous espérons qu'il voudra bien continuer à nous guider dans ce vaste champ de recherche.

M. le Professeur Ch. Kayser, qui a consacré un très grand nombre de travaux aux questions de l'hibernation naturelle et de l'hypothermie expérimentale, a bien voulu nous conseiller dans la partie physiologique de notre travail. De plus, il a réalisé pour nous la mise en hypothermie des rats et il nous a procuré les animaux hibernants dont nous avions besoin. Qu'il sache que nous lui en sommes profondément reconnaissant.

Aucun travail biochimique n'est actuellement possible à un chercheur isolé. Notre ami M. Roland Bidet, Docteur en Médecine, Assistant à l'Institut de Physiologie, a participé quotidiennement à nos recherches. C'est donc à lui en premier lieu que vont nos remerciements. M. Richard Jund, Licencié ès-Sciences, est depuis un an notre collaborateur immédiat. Nous lui savons gré de l'aide qu'il nous a apportée dans ce travail. Nous coopérons depuis longtemps avec M. Yves Godin, Licencié ès-Sciences, dans la plus parfaite amitié. Nous sommes heureux de lui dire ici combien nous nous réjouissons de l'avoir comme camarade de travail.

Nous avons pu apprécier l'esprit d'équipe qui règne à l'Institut de Chimie Biologique. Nous y avons en effet bénéficié des conseils de nombreux chercheurs, dont certains sont devenus nos amis. Nous pensons en particulier à Mlle Monique Jacob, Docteur ès-Sciences, Chargée de recherches au C. N. R. S., à Mlle Noëlle Virmaux, Licenciée es-Sciences, Attachée de recherches au C. N. R. S., à M. Jean Klethi, Licencié ès-Sciences, Assistant à la Faculté de Médecine et à M. Gérard Rebel, Licencié ès-Sciences, Attaché de recherches au C. N. R. S.

Nous avons bien souvent fait appel aux connaissances chimiques étendues de M. R. Bieth, Ingénieur-Chimiste, Docteur ès-Sciences, Chef de travaux à la Faculté de Médecine. Nous lui exprimons ici notre gratitude. Notre reconnaissance va également à Madame L. Mandel, Docteur en Médecine, Docteur ès-Sciences, Chef de Travaux à la Faculté de Médecine, qui nous a accueilli pendant quelque temps dans son équipe à notre arrivée au laboratoire et dont la gentillesse envers nous ne s'est jamais démentie. Nous avons aussi eu l'occasion de travailler un certain temps avec Mlle Monique Sensenbrenner,

Docteur és-Sciences, Attachée de recherches au C. N. R. S. Qu'elle sache que nous gardons un très bon souvenir de cette collaboration. Nous associons dans une même pensée amicale les autres chercheurs de cet Institut qui, tous à un moment ou à l'autre, ont eu l'occasion de nous aider.

Il nous tient particulièrement à coeur de remercier ici nos collaborateurs techniques successifs, M. J. -P. Lingelser, Mlles C. Schmitt et S. Cassel, dont la contribution à ce travail nous a été précieuse.

Il nous est agréable d'exprimer notre gratitude à tout le personnel technique de l'Institut, et plus spécialement à MM. E. Taubert, R. Fritsch et W. Reymann qui nous ont toujours rendu avec la plus grande amabilité les nombreux services que nous leur avons demandés.

Nos remerciements vont également à Mlle Henriette Lerner et à Madame I. Staub qui, très aimablement, ont apporté leur concours à la présentation et à la réalisation définitive de ce mémoire.

Notre reconnaissance s'adresse enfin au Laboratoire de Recherches de la Clinique Ste-Anne de Strasbourg et à l'Institut National d'Hygiène, qui nous ont apporté l'appui matériel nécessaire à notre expérimentation.

INTRODUCTION

On sait depuis fort longtemps (Edwards 1824 - Walther 1865 - Claude Bernard 1876 - Horvath 1876) que les mammifères hibernants présentent une résistance très remarquable à l'hypothermie. En effet, alors que la température centrale léthale d'un mammifère homéotherme varie entre 20°C et 15°C (Adolph 1951), un hibernant en sommeil supporte une température centrale de l'ordre de 5°C pendant très longtemps sans manifester ni collapsus cardio-vasculaire ni défaillance respiratoire.

Or, les travaux de Kayser (Kayser 1955 et 1958, Kayser et Richert 1958) sur le mécanisme de la mort des homéothermes en hypothermie ont montré qu'elle se produisait à la suite d'un arrêt respiratoire contemporain de l'arrêt des ondes cérébrales, qui survient vers 15°C. De plus, si l'on considère que l'activité des centres respiratoires et les ondes cérébrales persistent à 5°C lors du sommeil chez les hibernants (Lyman et Chatfield 1950 - Kayser, Rohmer et Hiebel 1951 - Chatfield et coll. 1951, Chatfield et Lyman 1954) il faut bien admettre que le tissu nerveux, par sa résistance particulière aux basses températures, doit jouer un rôle essentiel dans la résistance globale de l'organisme des hibernants à l'hypothermie.

Pour mieux analyser ce phénomène physiologique, il convient donc de chercher une explication à cette différence fonctionnelle entre les tissus nerveux de ces deux catégories de mammifères. Or, les neurochimistes sont actuellement convaincus que les fonctions cérébrales, et en particulier l'activité électro-corticale, sont, dans une large mesure, sous la dépendance directe de l'ATP présent dans le cerveau (Mandel et Weill 1962). Cette molécule biologique renferme en effet dans ses liaisons pyrophosphates la seule source d'énergie utilisable pour les diverses activités cellulaires : synthèses biochimiques, "transports actifs", activités électriques, etc... Certes, le groupement phosphoryle terminal de l'ATP et l'énergie qui lui est associée peuvent être transférés à une molécule de créatine pour former de la phospho-créatine, mais ce dernier corps ne représente qu'une forme de "mise en réserve" de l'énergie et ne sert qu'à "recharger" rapidement l'ATP lorsque ce dernier est utilisé et que les mécanismes fondamentaux formateurs d'ATP sont incapables d'assurer rapidement cette recharge.

Dès lors, l'activité du tissu nerveux dépend finalement de l'intensité de ses processus métaboliques formateurs d'ATP. Pour rendre compte des phénomènes physiologiques précédemment décrits, il fallait donc étudier ces divers processus dans le tissu nerveux des hibernants et dans celui des homéothermes.

En fait, c'est là un programme de recherche extrêmement vaste, aussi avons-nous choisi de nous limiter dans ce travail à un seul mécanisme producteur d'ATP : "l'étape succinate-fumarate" du cycle des acides tricarboxyliques de KREBS.

On sait que cette dernière se ramène schématiquement à la réaction globale suivante :

$$\text{succinate} + \text{FAD} \xrightarrow[\text{déhydrogénase}]{\text{succino-}} \text{fumarate} + \text{FADH}_2$$

Les deux atomes d'hydrogène qui ont été enlevés au substrat par la déhydrogénase sont ensuite transférés sur l'oxygène pour former de l'eau. Ce transfert se fait par une série d'intermédiaires qui constituent une "chaîne d'oxydation mitochondriale". Au cours de ce transport, se produisent, d'un composé à l'autre de la chaîne, des dénivellations du potentiel d'oxydo-réduction dont l'énergie est partiellement récupérée dans l'ATP sous forme de liaisons pyrophosphates dites "riches en énergie", le reste étant dissipé en chaleur.

Ainsi, à l'oxydation de succinate, qui aboutit finalement à une formation d'eau, se trouve associée une certaine production d'ATP par phosphorylation de l'ADP suivant la réaction endergonique globale :

$$\text{ADP} + \text{PO}_4^{\equiv} \longrightarrow \text{ATP}$$

C'est à l'ensemble de ce phénomène que l'on donne le nom de "phosphorylation oxydative" ou d' "oxydo-réduction phosphorylante couplée au transfert"ou enfin de "phosphorylation couplée aux oxydations". En somme, chaque fois qu'une molécule de succinate est oxydée, un atome d'oxygène est utilisé pour donner une molécule d'eau et il se forme en même temps un certain nombre de molécules d'ATP. C'est ce nombre, égal au nombre de molécules de phosplate inorganique utilisées dans cette formation qu'on appelle "rapport P/O". Cette importante notion de rapport P/O, encore appelé "quotient de phosphorylation", a été introduite en biochimie par Kalckar en 1937. On admet que ce rapport est théoriquement égal à 2 pour le succinate. (Morrison 1961).

En fait, si toutes les notions que nous venons de rappeler sont très classiques, le détail de ces phénomènes est extrêmement complexe et fait encore l'objet de nombreuses controverses, comme le montrent les mises au point les plus récentes (Green et Fleischer 1961 - Goodwin 1960 - Racker 1961 - Morrison 1961 - Lehninger et Wadkins 1962). Aussi nous sommes-nous borné à une étude globale du phénomène puisque notre problème était avant tout un problème de neurochimie physiologique.

D'emblée, nous nous sommes heurté à une difficulté expérimentale : quelle méthode et quelles conditions fallait-il employer pour mesurer le rapport P/O. ? La littérature biochimique offre en effet une très grande variété d'indications sur ce point. Ces indications sont même souvent contradictoires, si bien que Green et Beinert (1955) sont allés jusqu'à écrire : "La phosphorylation oxydative est à la fois l'émerveillement et le désespoir de ceux qui ont choisi de travailler ce sujet". Aussi avons-nous dû, préalablement à l'étude comparative des phosphorylations oxydatives du cerveau des hibernants et des homéothermes, mettre au point une méthode adaptée à notre but. C'est pourquoi le travail que nous rapportons ici porte à la fois sur nos recherches techniques et sur nos recherches biologiques, que nous exposerons successivement.

PREMIÈRE PARTIE

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Nous n'exposerons dans cette partie que les méthodes et les techniques que nous avons empruntées à la littérature sans y apporter de grandes modifications. Nous réservons pour la seconde partie la description de la méthode de mesure du rapport P/O, qui a fait l'objet de mises au point et de recherches personnelles.

A - CHOIX DES ANIMAUX -

Nos recherches ont porté sur deux catégories de mammifères, des hibernants d'une part, des homéothermes de l'autre. En raison de l'influence possible de l'équilibre hormonal sur les phosphorylations oxydatives, nous avons utilisé uniquement des individus du sexe mâle.

1/ Mammifères hibernants.

Les hibernants appartenaient à deux espèces : Hamster des champs (Cricetus cricetus) et Spermophile (Citellus citellus). Ils ont été répartis en quatre séries suivant les conditions physiologiques :

- Des hamsters d'hiver, sacrifiés en janvier, après avoir vécu trois semaines dans une ambiance de 7°C et se trouvant en sommeil hibernal. La température rectale de ces animaux était comprise entre 5°C et 7,5°C.

- Des hamsters d'hiver semblables aux précédents mais qui étaient réveillés et dont la température centrale était normale (37°C).

- Des spermophiles d'hiver sacrifiés également en janvier. Ils étaient réveillés et avaient une température rectale normale (37°C).

- Des hamsters d'été sacrifiés en juillet après avoir vécu à la température du laboratoire.

2/ Mammifères homéothermes.

Nous avons étudié deux espèces d'homéothermes : des rats blancs (souche Wistar Commentry) de 8 à 12 mois pesant de 300 à 350 g et des cobayes d'un poids moyen de 400 g. Ces animaux ont été répartis en cinq séries :

- Des rats ayant vécu à la température du laboratoire.

- Des cobayes ayant également vécu à la température du laboratoire.

- Des rats maintenus pendant 8 à 12 jours dans une ambiance de 7°C, analogue à celle dans laquelle se trouvaient les hibernants sacrifiés en hiver.

- Des rats anesthésiés mis en hypothermie artificielle selon une technique précisée par ailleurs.

- Des rats témoins anesthésiés ayant reçu en plus de l'atropine, mais ayant gardé une température centrale normale, contrairement aux précédents.

B - METHODE UTILISEE POUR REALISER L'HYPOTHERMIE ARTIFICIELLE DU RAT -

Les rats sont d'abord anesthésiés par du nembutal à 6,5 p. cent à raison de 0,1 ml pour 100 g de poids vif. La bronchosécrétion est considérablement diminuée par 0,1 à 0,2 ml pour 100 g de poids vif d'une solution de sulfate d'atropine à 0,1 p. cent. Après trachéotomie, l'animal est curarisé par 0,2 ml de d-tubocurarine à 1 p. cent. Toutes ces injections sont faites par voie intrapéritonéale. L'animal est mis en respiration artificielle au carbogène (95 p. cent d'oxygène, 5 p. cent d'anhydride carbonique) grâce à une pompe Palmer (modèle pour petits animaux) réglée pour un "volume courant" de 4 ml et une fréquence respiratoire de 70 cycles par minute.

L'hypothermie artificielle est alors réalisée par réfrigération externe. Pour cela, le rat est placé sur le fond d'une chambre froide entièrement métallique de 18 × 29 × 11 cm. L'air qu'elle contient est maintenu à une température de 5°C grâce à un mélange réfrigérant de glace pilée et de chlorure de sodium placé dans la double paroi de la chambre. Le double fond sur lequel repose directement l'animal est également rempli par le mélange réfrigérant. La température de l'animal est mesurée par une thermosonde rectale (couple cuivre-constantan) et inscrite de façon continue sur l'enregistreur automatique Speedomax de Leeds et Northrup. On bloque la température centrale de l'animal lorsqu'elle se situe entre 12°C et 11°C, en plaçant une lampe de 100 W au-dessus de la chambre froide dont on a enlevé le toit. L'électrocardiogramme (E.C.G.) est recueilli suivant la "dérivation langue-anus" sur un corticographe Alvar avec inscription à encre.

Le tableau I résume l'évolution de la température rectale des cinq rats ainsi mis en hypothermie expérimentale. La figure 1 donne, à titre d'exemple, la courbe thermique complète enregistrée pour un animal (rat n° 3). On voit que l'abaissement est très progressif. Soulignons que, grâce à la narcose et à la curarisation, nous évitons chez ces animaux toute lutte contre le froid. Nous avons maintenu en moyenne 53 minutes la température au-dessous de 15°C, dont 33 minutes entre 12°C et 11°C. Nous avons cherché à main-

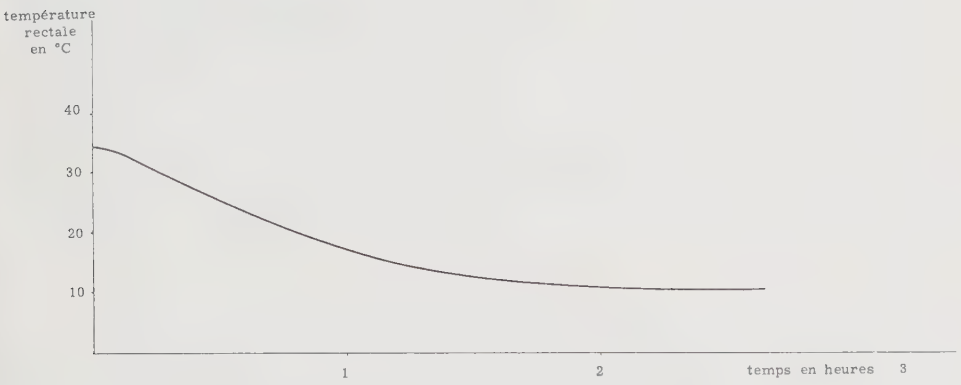


Figure 1 - Evolution de la température d'un rat (rat n° 3) au cours d'une expérience d'hypothermie expérimentale.

tenir le plus longtemps possible cette hypothermie au-dessous de 15°C car Kayser (1955 et 1958) a établi que l'arrêt des ondes cérébrales se produit chez les homéothermes lorsque la température atteint cette valeur à la base du crâne. La respiration artificielle permet d'éviter l'arrêt respiratoire qui se produirait également à cette température (Kayser 1955 et 1958). De plus, elle permet au coeur de continuer à battre jusqu'au voisinage de 10°C (Kayser et Richert, 1958). Nous sommes donc resté au-dessus de cette température en surveillant constamment l'E.C.G. de l'animal.

Tableau I

Durée de l'hypothermie artificielle
réalisée chez les 5 rats utilisés

Rat n°	Température au début de l'enregistrement	Durée de l'hypothermie en minutes		
		au dessus de 15°C	au dessous de 15°C	entre 12 et 11°C
1	33°C	60	35	20
2	33°C	71	41	22
3	34°C	80	98	84
4	34°C	72	52	18
5	36°C	77	39	21

Nous donnons, à titre d'exemple, dans la figure 2 l'évolution de l'E.C.G. d'un animal (rat n° 5) au cours d'une expérience. On y retrouve les effets de la température sur l'E.C.G. du rat observés par Kayser (1957a), en particulier l'onde de repolarisation rapide primitivement décrite par Richards, Simonson et Visscher (1953) sur les coeurs à rythme très rapide. La fréquence cardiaque diminue en fonction de la température mais le rythme reste régulier jusqu'au voisinage de 12°C, stade auquel nous avons observé une certaine variation individuelle. Nous n'avons jamais constaté, dans nos conditions expérimentales, de troubles importants de la conduction auriculo-ventriculaire, à type de "bloc", mais nous avons noté parfois la présence de quelques extrasystoles ventriculaires vers 12 ou 11°C. Dès leur apparition, ou en présence d'un effondrement brutal de la fréquence cardiaque, nous avons arrêté l'expérience et sacrifié l'animal pour éviter le collapsus cardio-vasculaire et sa conséquence, l'anoxie, susceptible de déterminer des perturbations métaboliques cérébrales interférant avec les modifications dues à l'hypothermie proprement dite que nous désirions étudier.

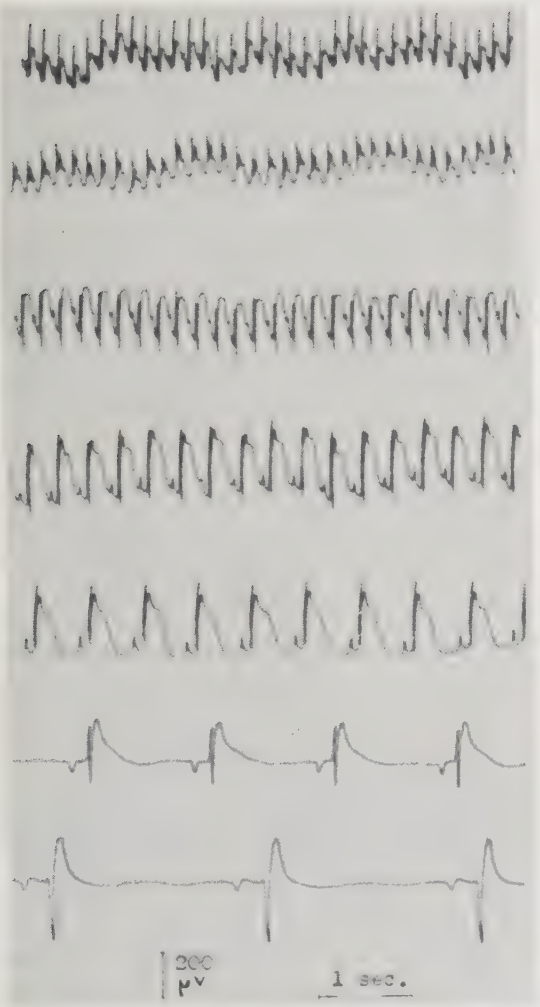


Figure 2 - Evolution de l'E. C. G. d'un rat en hypothermie expérimentale (rat n° 5).

C - PREPARATION DES HOMOGENATS -

1/ Homogénats de cerveau.

Compte tenu des observations faites par Packer (1957) sur les effets du "choc", nous avons pris soin de maintenir les animaux calmes jusqu'au moment du sacrifice effectué par décapitation. La tête est immédiatement plongée dans une solution glacée de ClNa à 9 p. mille et le cerveau est disséqué le plus rapidement possible. Il est alors débarassé des méninges, lavé dans une solution glacée de saccharose isotonique et séché sur un papier filtre avant la détermination du poids frais (P. F.).

Le broyage est effectué pendant deux minutes dans du saccharose (Analar) 0,25 M à raison de 7 ml par g de P.F. Nous avons utilisé le broyeur de la Thomas Co (Philadelphie) à cylindre en Pyrex et piston en Téflon selon les conseils de Weill (1958). Pendant toute la durée du broyage, le cylindre reste plongé dans la glace et le piston tourne à 1 200 tours/minute.

Dès la fin du broyage des prises de 0,4 ml d'homogénat, correspondant à 50 mg de P.F. de cerveau, sont introduites dans les fioles de Warburg contenant le milieu d'incubation.

2/ Homogénats de myocarde.

Pour certains hamsters sacrifiés en juillet, nous avons également incubé des homogénats de myocarde préparés selon la technique proposée par Bidet (1962). Après dissection du cerveau, nous avons ouvert le thorax de l'animal et prélevé les ventricules cardiaques. Après lavage et pesée, nous les avons broyés dans un homogénéiseur semblable au précédent mais pendant 3 à 4 minutes et en utilisant 14 ml de saccharose 0,25 M par g de P.F.

Là encore, une prise de 0,4 ml, correspondant à 26,6 mg de myocarde frais, est introduite dans chaque fiole de Warburg.

D - PREPARATION DES MITOCHONDRIES PAR FRACTIONNEMENT CELLULAIRE -

Bien que d'autres types de méthodes aient été employés, comme la chromatographie sur colonne (Riley et coll. 1948), la centrifugation avec gradient de densité (Kuff et Schneider 1954 - Thomson et Mikuta 1954), c'est le fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle qui reste la méthode la plus généralement adoptée depuis les travaux classiques de Hogeboom, Schneider et Pallade (1948). De nombreux milieux d'isolement ont été utilisés, les plus satisfaisants sont à base de saccharose. Pour ces derniers, diverses concentrations ont été employées, allant de 0,88 M à 0,25 M (Slater et Cleland 1953).

Les études morphologiques, faites au microscope électronique, ont montré certaines altérations dans le saccharose 0,25 M alors que le saccharose 0,88 M assure une bonne conservation structurale (Green et Fleischer 1960) ; cependant les biochimistes ont surtout utilisé les milieux isotoniques. Pour notre part, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Slater et Cleland (1953). Ces auteurs ont étudié l'effet de la tonicité du milieu d'isolement sur la respiration et l'activité phosphorylante des mitochondries. Rejetant le saccharose hypertonique, ils préconisent le saccharose isotonique en recommandant l'adjonction d'éthylène-diamine-tétracétate (E.D.T.A.), qui empêche les modifications morphologiques et les inactivations enzymatiques. (Slater et Cleland 1952). Nous avons donc adopté le saccharose 0,3 M avec E.D.T.A. 10^{-4}M.

Nous nous sommes efforcé de suivre les indications de Weinbach (1959) qui insiste sur la nécessité d'apporter une attention méticuleuse à tous les détails expérimentaux du fractionnement, en particulier à la rapidité des manipulations et au contrôle de la température. Pour ce dernier point, la vitrine réfrigérée au dessous de O°C, décrite par Mandel en 1959, nous a été d'une grande utilité.

Voici le mode opératoire : le cerveau est prélevé et broyé dans les mêmes conditions que pour la préparation des homogénats, mais en utilisant du saccharose 0,3 M avec E.D.T.A. 10^{-4} M. Le fractionnement est réalisé à l'aide d'une ultracentrifugeuse Spinco (modèle L) réfrigérée à O°C. Suivant le procédé classique, les noyaux sont d'abord déposés à 3 000 g (1) pendant 10 minutes. Le surnageant est soumis à une nouvelle centrifuation à 12 000 g pendant 20 minutes. Le culot contenant les mitochondries est remis en suspension dans le milieu d'isolement puis centrifugé pendant 20 minutes à 13 000 g. Le surnageant est décanté ainsi que le dépôt liquide qui peut apparaître aux côtés des mitochondries bien sédimentées et que les auteurs anglo-saxons ont baptisé "fluffy-layer". Les mitochondries sont alors remises en suspension dans le milieu d'isolement à raison de 3 ml/g de cerveau frais dans le cas des homéothermes et 4 ml/g de cerveau frais dans celui des hamsters.

Des prises de 0,4 ml de suspension mitochondriale sont alors immédiatement introduites dans les fioles de Warburg contenant le milieu d'incubation.

E - TECHNIQUES ANALYTIQUES -

1/ Mesure de la consommation d'oxygène.

Nous avons employé la méthode manométrique de Warburg telle qu'on la trouvera exposée dans l'ouvrage classique d'Umbreit et coll. "Manometric Techniques" (1957). Les incubations ont été effectuées à 37°C en présence d'air. Après une stabilisation thermique de 15 minutes la respiration a été suivie pendant 30 minutes.

2/ Dosage du phosphore.

La formation d'ATP liée à la consommation d'oxygène a été déterminée par la quantité de $PO_4^{\equiv}$ (Pi) disparue du milieu au cours de l'incubation. Les techniques les plus employées pour le dosage du Pi sont photocolorimétriques. Toutes reposent sur sa transformation en phosphomolybdate d'ammonium qui donne une coloration bleue, due à la formation de sous-oxyde de molybdène, en présence d'un réducteur. De nombreuses variantes techniques portant sur le pH, la salinité et surtout la nature de l'agent réducteur, existent dans la littérature.

Nous avons d'abord essayé la méthode de Bell et Doisy (1920) modifiée par Briggs (1922) et par Macheboeuf et Delsal (1943), mais nous avions toujours une certaine hydrolyse de l'ATP présent dans l'échantillon, due au milieu acide dans lequel se développe la coloration. Les procédés employant l'extraction rapide du phosphomolybdate avant la réduction nous ont semblé préférables à cause de la présence de cet ATP très facilement hydrolysable. C'est dans ce but que Martin et Doty en 1949 ont modifié l'extraction à l'isobutanol, initialement décrite par Berenblum et Chain (1938). Nous avons adopté cette technique de dosage qui présente en outre l'avantage d'être rapide et

---

(1) g = accélération due à la pesanteur. Malheureusement, ce symbole est le même que celui qui désigne le gramme, mais selon le contexte le lecteur attribuera au symbole g la signification qui convient.

Nous indiquons toujours l'accélération au fond du tube.

directement applicable aux solutions contenant des protéines grâce à la défécation au silicotungstate qu'elle comporte. Enfin, elle donne une coloration immédiate et stable pendant 24 heures.

Voici le mode opératoire : l'échantillon de 1 ml est amené à un volume de 3 ml avec de l'eau. Puis on ajoute successivement :

- 5 ml d'un mélange (1 vol./1 vol.) d'isobutanol et de benzène.

- 1 ml de silicotungstate de sodium (1).

- 1 ml de molybdate d'ammonium à 5 p. cent dans l'acide sulfurique 4 N.

On agite alors vigoureusement le tube pendant 20 secondes puis on laisse les deux phases se séparer. A leur limite, ainsi que dans la phase aqueuse, on observe le précipité protéique. On pipette dans un nouveau tube 1 ml de la phase organique et l'on ajoute :

- 8,8 ml d'une solution d'acide sulfurique dans l'alcool absolu (20 ml d'acide sulfurique concentré dans 980 ml d'alcool absolu).

- 0,2 ml d'une solution de chlorure stanneux préparée le jour même en complétant à 200 ml, avec de l'acide sulfurique N, 1 ml d'une solution mère de Cl_2Sn, $2\,H_2O$ à 40 p. cent dans l'acide chlorhydrique concentré. Cette solution mère doit être conservée à l'obscurité.

On détermine alors la D.O. au spectrophotomètre Coleman Junior à 650 mμ contre un témoin préparé de la même façon mais contenant 1 ml d'eau distillée à la place de l'échantillon.

Avec des tubes de 19 mm de trajet optique, une unité de D.O. correspond à 56,4 μg de Pi dans l'échantillon initial. L'étalonnage a été effectué à partir d'une solution connue de phosphate monopotassique. Tel que nous venons de le décrire, ce dosage convient pour des quantités de phosphore allant de 10 à 60 μg. Notons qu'il est possible de l'adapter, comme nous l'avons vérifié, à des quantités plus faibles allant de 2,5 à 15 μg en augmentant à 4 ml la prise de la phase organique sur laquelle on réalise la réaction colorée proprement dite. Cette technique devient alors aussi sensible que celle de Chen, Toribara et Warner (1956) utilisant l'acide ascorbique comme agent réducteur.

La technique de Martin et Doty a déjà été employée dans l'étude des phosphorylations oxydatives par Lindberg et coll. (1953), par Nielsen et Lehninger (1955) et par Panogos, Beyer et Masoro (1958). Nielsen et Lehninger (1955) ont, pour leur part, utilisé comme déféquant l'acide trichloracétique. A la suite de ces travaux, Hagihara et Lardy (1960) ont critiqué cette méthode et proposé un procédé de séparation du complexe phosphomolybdique par chromatographie en phase inversée sur colonne de célite siliconée. Ces auteurs font en effet remarquer qu'une erreur appréciable est introduite dans le dosage selon Martin et Doty, par le fait, qu'après la séparation de la phase isobutanol-benzène et de la phase aqueuse, il persiste des gouttelettes d'une phase en émulsion dans l'autre phase. Mais on ne doit tenir compte

---

(1) Ce réactif est préparé en dissolvant 2,45 g de silicate de sodium sec et 79,4 g de tungstate de sodium, $2\,H_2O$ dans 500 ml d'eau. On porte pendant 5 h à l'ébullition après adjonction de 15 ml d'acide sulfurique concentré, on filtre et on complète à 1 litre avec de l'eau.

de cette objection que lorsqu'on effectue la réaction colorée sur la totalité de la phase organique comme l'on fait Nielsen et Lehninger. En réalisant la coloration sur une partie aliquote seulement de la couche d'isobutanol-benzène, on évite facilement cette erreur, d'autant plus que les gouttelettes de la phase aqueuse qui demeurent en émulsion dans la phase organique sont toutes localisées sur les parois du tube. Il ne nous a donc pas paru souhaitable d'abandonner la technique de Martin et Doty, plus simple, au profit de celle de Hagihara et Lardy.

3/ Dosage du glucose-6-phosphate (G-6-P).

Dans certaines expériences faites pour justifier notre méthode de mesure du rapport P/O, nous avons été amené à doser, parallèlement au Pi disparu, le G-6-P produit par le "système-piège" glucose-hexokinase présent dans notre milieu.

Pour cela, nous avons bloqué les réactions par l'acide perchlorique à la concentration finale 0,6 N, puis nous avons éliminé les protéines par une centrifugation de 10 min. à 26 000 g dans une centrifugeuse Servall (modèle SS 1) placée dans une chambre froide à O°C. Le surnageant a été alors recueilli et neutralisé à O°C avec de la potasse. Le perchlorate de potassium formé se dépose en 15 min. Il est alors éliminé par une centrifugation de 10 min. à 4 000 g dans une centrifugeuse Jouan (modèle G 60) réfrigérée à - 5°C.

Dans le surnageant ainsi obtenu, nous avons dosé le G-6-P par la G-6-P deshydrogénase, selon la technique de Horecker et Kornberg (1948) légèrement modifiée. On sait qu'au cours de la réaction :

$$\text{G-6-P} + \text{TPN}^+ \longrightarrow \text{6-phosphogluconate} + \text{TPNH} + \text{H}^+$$

catalysée par cet enzyme, il se forme une molécule de TPN réduit pour une molécule de G-6-P oxydée. Comme le TPN réduit présente un maximum d'absorption à 340 mμ, il est possible de le doser en mesurant l'augmentation de l'absorption à cette longueur d'onde après addition de l'enzyme. Nous avons utilisé pour cela un spectrophotomètre Jobin et Yvon en réalisant la réaction dans un milieu dont les divers constituants avaient les concentrations finales suivantes : $MgCl_2$ 0,033 M, tampon tris (trihydroxyméthyl-aminométhane) pH 7,8 0,66 M, TPN (Sigma) 0,004 M et 3,33 unités définies selon Beisenhertz et coll. (1953) de glucose-6-phosphate deshydrogénase (Boehringer) par ml. La détermination est faite dans une cuvette en quartz dont le trajet optique est de 1 cm contre un témoin contenant le milieu réactionnel mais dépourvu de G-6-P. Dans ces conditions, une augmentation de la D.O. d'une unité, après addition de l'enzyme, correspond à 6,21 μg de G-6-P par ml de milieu réactionnel. L'étalonnage a été effectué avec une solution connue de G-6-P (Sigma).

4/ Dosage des protéines.

Sur une partie aliquote des suspensions mitochondriales, nous avons dosé les protéines selon la méthode de Gornal et coll. (1949) utilisant la classique réaction du biuret.

Voici le mode opératoire : la prise de la suspension mitochondriale est amenée à un volume de 0,5 ml avec du NaCl à 9 p. mille. On ajoute alors 2 ml d'un réactif préparé de la manière suivante : 1,5 g de SO_4Cu, 5 H_2O et 6 g de tartrate double de Na et de K, 4 H_2O sont dissous dans 500 ml d'eau ; on ajoute alors, en agitant constamment, 400 ml de soude à 10 p. cent

et de l'eau q.s.p. 1 000 ml. Après 30 min. on détermine l'intensité de la coloration violette apparue à l'aide d'un spectrophotomètre Jobin et Yvon à 540 mμ contre un témoin préparé de la même façon mais dans lequel la prise a été remplacée par un volume égal de NaCl à 9 p. mille. Avec des cuves en verre dont le trajet optique est de 1 cm, une unité de D.O. correspond à 9,25 mg de protéines. L'étalonnage a été effectué à partir d'une solution de sérum-albumine (Sigma) à 1 p. cent.

F - MODE D'EXPRESSION DES RESULTATS -

Les résultats sont présentés le plus souvent sous forme de la moyenne arithmétique $\bar{x}$ des n valeurs x déterminées expérimentalement :

$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$$

Pour apprécier la dispersion, nous calculons l'écart-type S :

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Précédée du signe ±, il accompagne la moyenne. Rappelons que pour une distribution normale, les 2/3 des résultats sont compris dans l'intervalle $\bar{x} \pm S$ et 95 p. cent des résultats dans l'intervalle $\bar{x} \pm 2S$.

G - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS -

1/ Analyse de variance.

Pour pouvoir comparer les consommations d'oxygène des divers groupes d'animaux ainsi que les quantités d'ATP formées, nous avons effectué une analyse de variance (Lison 1956). Rappelons qu'elle consiste essentiellement à décomposer la variance totale Σx_T^2 d'un ensemble en variances partielles : "variance entre groupes" Σx_E^2 et "variance intragroupe" Σx_I^2. On a :

$$\Sigma x_T^2 = \Sigma x_E^2 + \Sigma x_I^2$$

De même, pour le nombre de degrés de liberté attaché à ces variances, on a :

$$dl_T = dl_E + dl_I$$

On compare alors les variances partielles entre elles au moyen d'un test appelé "test F" :

$$F = \frac{\frac{\Sigma x_E^2}{dl_E}}{\frac{\Sigma x_I^2}{dl_I}}$$

Une table des F, à double entrée, donne pour les valeurs de dl_I et dl_E la probabilité p pour que la différence des moyennes soit due au hasard.

Comme la plupart des auteurs, nous admettons que la différence constatée est "significative" lorsque $p \leqslant 0,05$, c'est-à-dire lorsque cette différence a au moins 95 chances sur cent de n'être pas due au hasard. Nous appelons "hautement significative" une différence qui a au moins 99 chances sur 100 de n'être pas due au hasard ($p \leqslant 0,01$).

2/ Analyse de covariance.

Pour comparer les rapports P/O des divers groupes d'animaux, nous avons effectué une analyse de covariance par la méthode dite "des Y réduits" (Lison 1956) qui équivaut à faire une analyse de variance sur les données Y ajustées à la valeur moyenne des X : Y représente les valeurs placées au numérateur, c'est-à-dire ici les formations d'ATP, y^2 étant leur variance, X représente les valeurs placées au dénominateur, c'est-à-dire les consommations d'oxygène, x^2 étant leur variance.

On calcule également un "test F" :

$$F = \frac{\left[\Sigma y_T^2 - \frac{(\Sigma x_T y_T)^2}{\Sigma x_T^2}\right] - \left[\Sigma y_I^2 - \frac{(\Sigma x_I y_I)^2}{\Sigma x_I^2}\right]}{dl_\varepsilon} \Bigg/ \frac{\Sigma y_I^2 - \frac{(\Sigma x_I y_I)^2}{\Sigma x_I^2}}{dl_I}$$

On se rapporte à la table des F dans les mêmes conditions que pour l'analyse de variance.

3/ Test de Bartlett.

Pour pouvoir calculer, pour chaque comparaison, l'expression $\frac{\Sigma x_I^2}{dl_I}$, au cours de l'analyse de variance, à partir de l'ensemble des valeurs expérimentales, il est nécessaire que les variances soient homogènes (Lison 1956). Ceci est vérifié par le test de Bartlett (Edwards 1950), calculé d'après la formule :

$$\chi^2 = e\left[\Sigma dl.\ \log \frac{\Sigma \Sigma x^2}{\Sigma dl} - \Sigma\ (dl.\ \log x^2)\right]$$

e : base des logarithmes népériens,

x^2 : variance des valeurs pour un groupe,

dl : nombre de degrés de liberté pour un groupe.

Une table des χ^2 donne, à la ligne correspondant au nombre de degrés de liberté Σdl, la probabilité p pour que les variances ne soient pas homogènes. Les variances peuvent être considérées comme homogène lorsque $p \geqslant 0,05$, c'est-à-dire qu'elles ne diffèrent pas significativement les unes des autres.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

EXPOSÉ ET JUSTIFICATION DE LA MÉHODE ET DES CONDITIONS EMPLOYÉES POUR LA MESURE DU RAPPORT P/O

L'examen de la littérature biochimique concernant les phosphorylations oxydatives, telle qu'elle se trouve résumée dans les revues les plus récentes, comme celles de Green et Fleischer (1961), de Goodwin (1960), de Racker (1961) et de Lehninger et Wadkins (1962), montre qu'il existe une très grande variété dans les méthodes et les conditions employées pour la mesure du rapport P/O. Il nous a donc semblé nécessaire, avant d'aborder l'étude comparative des phosphorylations oxydatives du cerveau des homéothermes et des hibernants, de justifier notre méthode par la discussion des données bibliographiques et par des vérifications expérimentales.

Nous désirions, pour des raisons pratiques, employer une technique manométrique de détermination de la consommation d'oxygène. Nous ne ferons donc pas intervenir dans cette discussion la méthode polarographique de Chance et Williams (1955).

Il nous paraît que les problèmes pratiques posés portent principalement sur trois points :

- Choix du milieu et des conditions d'incubation.
- Choix du procédé expérimental général.
- Choix de la méthode d'évaluation de la quantité d'ATP formé.

Nous les envisagerons successivement.

Nous rapporterons dans un quatrième paragraphe les expériences d'inhibition effectuées pour vérifier que c'est bien le rapport P/O lié à l'utilisation du succinate que nous mesurons. Enfin nous montrerons que, dans nos conditions expérimentales, aucune inhibition par l'oxaloacétate endogène ne peut se manifester.

A - CHOIX DU MILIEU ET DES CONDITIONS D'INCUBATION -

Aldridge (1957) a insisté sur le fait que, dans les études portant sur les mitochondries du cerveau, il convient d'utiliser des conditions expérimentales différentes suivant le but poursuivi. Si le mécanisme des réactions catalysées par les enzymes mitochondriaux est le centre d'intérêt principal, il faut opter pour les conditions dans lesquelles ces réactions sont optima. Si l'on désire, par contre, obtenir des renseignements sur un problème de neurochimie physiologique, il faut alors employer des conditions se rapprochant le plus possible de l'environnement intracellulaire, pour pallier, dans

une certaine mesure, les inconvénients de l'expérimentation *in vitro*. Aldridge a envisagé ce dernier cas dans ses travaux.

Or, nous voulions étudier les modifications des phosphorylations oxydatives cérébrales au cours de l'hibernation. Il s'agissait bien là d'un problème de neurochimie physiologique. Aussi nous sommes-nous appuyé sur les données d'Aldridge pour le choix du milieu et des conditions d'incubation.

Nous avons opéré à pH 7, valeur proche de celle couramment admise pour le pH intracellulaire (Caldwell 1954), bien que le pH 7,4, voisin du pH optimum de la succinodéhydrogénase (Bonner 1955), soit le plus employé (Hunter 1955, Potter 1957). De même, nous avons préféré les sels du potassium à ceux du sodium à cause de la richesse du milieu intracellulaire en potassium. Enfin, pour la même raison, nos incubations ont été faites à 37°C bien que Brody et Bain (1952) aient montré qu'à 18°C les préparations conservent pendant plus longtemps leur activité maximum. Nous avons d'ailleurs vérifié que la respiration et la phosphorylation restent linéaires pendant nos 30 minutes d'observation.

La composition de notre milieu d'incubation le rend proche du milieu intracellulaire cérébral tel que le décrit Aldridge (1957). Les concentrations finales des divers constituants, après adjonction de la prise d'homogénat ou de suspension mitochondriale, sont : KCL 0,05 M ; $MgCl_2$ 0,007 M ; KF 0,025 M ; E.D.T.A. 0,001 M ; tampon phosphate de potassium à pH 7 0,0075 M ; ADP (Sigma) 0,0025 M ; ATP (Sigma) 0,0003 M ; glucose 0,06 M ; succinate de sodium (Boehringer) 0,02 M ; hexokinase de levure (Sigma type III) : 200 unités (définies selon Berger et coll. 1946) par fiole. Pour les incubations de mitochondries, la concentration du KF est seulement 0,01 M.

Ce milieu renferme bien les matériaux nécessaires à la formation de l'ATP, c'est-à-dire un tampon phosphate et de l'ADP. L'emploi de l'ADP, accepteur normal de phosphoryle *in vivo* (Barkulis et Lehninger 1951 - Kielley et Kielley 1951 - Krebs et coll. 1951 a), nous semble en effet préférable à celui de l'AMP parfois relaté dans la littérature (Hunter 1955, Lowy 1957).

Ce milieu renferme en outre deux systèmes inhibiteurs d'ATPase(1). On sait en effet que la principale difficulté rencontrée dans la mesure du rapport P/O est "l'activité ATPasique" des homogénats et des mitochondries. Pour la supprimer, on dispose de trois méthodes principales que nous allons examiner successivement.

L'élimination de l'ATPase peut d'abord se faire par des lavages répétés (Slater 1953) de la préparation. Ce procédé n'est évidemment pas applicable aux homogénats, mais même pour les mitochondries isolées nous ne l'avons pas employé. Chance et Williams (1956) ont en effet montré que les préparations ainsi effectuées sont très labiles. De plus, les mitochondries lavées ont perdu de nombreux cofacteurs (FAD, cytochrome c, etc.) qu'il faut ensuite ajouter au milieu d'incubation. Pour toutes ces raisons, cette méthode, qui demeure intéressante pour l'étude du mécanisme des réactions catalysées par les systèmes polyenzymatiques mitochondriaux, ne nous paraît pas adaptée à une expérimentation de biochimie physiologique.

---

(1) Nous employons ici, pour la commodité de l'exposé, le terme "ATPase". Il ne désigne pour nous que "l'activité ATPasique" des préparations, observée par tous les auteurs, sans préjuger aucunement de son mécanisme ni des systèmes uni ou plurienzymatiques qu'elle implique, objets de nombreuses controverses (cf. Lehninger et Wadkins 1962).

Une seconde méthode consiste à inhiber l'ATPase par le fluorure, comme l'a proposé Kalckar dès 1937. Enfin, on peut introduire dans le milieu d'incubation un "système-piège" (Ochoa 1943 - Loomis et Lipmann 1948). Un tel système, comprenant un substrat S et un enzyme E, doit être capable d'utiliser l'ATP dans une réaction du type suivant :

$$S + ATP \xrightarrow{E} S - P + ADP$$

Cette réaction est rendue quantitative par l'emploi d'un excès de substrat et d'enzyme. Dans ces conditions il se produit une inhibition de l'ATPase par compétition. De plus, le taux d'ADP demeure constamment élevé dans le milieu, or l'ADP inhibe lui aussi l'ATPase (Kielley et Kielley 1953). Deux "systèmes-pièges" principaux ont été proposés :

- Le glucose en présence d'hexokinase (Siekevitz et Potter 1953) qui utilise l'ATP dans une réaction formant du G-6-P :

$$glucose + ATP \xrightarrow{hexokinase} G\text{-}6\text{-}P + ADP$$

- La créatine en présence de créatine-phosphokinase (Ochoa 1943) qui utilise de l'ATP dans une réaction formant de la phospho-créatine :

$$créatine + ATP \xrightarrow{créatinephosphokinase} créatine\text{-}phosphate + ADP$$

Ce dernier système est employé par certains auteurs (Potter 1957, Lardy et Wellman 1952) de préférence au système glucose-hexokinase pour les incubations d'homogénats. En effet, la glucose-6-phosphatase des microsomes peut détruire le G-6-P en libérant du Pi suivant la réaction :

$$G\text{-}6\text{-}P \xrightarrow{glucose\text{-}6\text{-}phosphatase} glucose + Pi$$

Or, on estime l'ATP formé soit d'après la quantité de G-6-P produit par le "système piège", soit d'après la quantité de Pi disparue du milieu d'incubation, donc cette activité glucose-6- posphatasique est une importante cause d erreur dans cette estimation. Malheureusement, le système créatine-créatine-phosphokinase ne semble pas pouvoir remédier à une telle erreur, puisque la phosphocréatine formée est, elle aussi, très labile et se dégrade spontanément en créatine en libérant du Pi.

Il nous semble que l'emploi simultané du fluorure et du "système-piège" glucose-hexokinase, souvent rencontré dans la littérature (Hunter 1955), demeure le plus satisfaisant. Nous avons pu vérifier en effet (cf. infra) que le fluorure seul n'est pas un inhibiteur suffisant de l'ATPase, dans nos conditions d'incubation. Nous l'avons cependant maintenu car il supprime un certain nombre de réactions secondaires gênantes. Tout d'abord, il inhibe la glucose-6-phosphatase (Hunter 1955), évitant ainsi l'erreur précédemment évoquée. De plus, il inhibe l'énolase (Bucher 1955) et empêche par conséquent toute dégradation glycolytique du glucose présent dans le milieu ainsi que du G-6-P produit par le "système-piège". Ce dernier point est extrêmement important si l'on emploie le dosage du G-6-P pour apprécier la formation d'ATP. Même avec une autre méthode d'estimation de la production d'ATP, il convient d'ailleurs d'éviter cette "fuite glycolytique" puisqu'elle aboutirait à une disparition de Pi et à une néoformation d'ATP interférant avec celles liées à

l'utilisation du succinate. Nous attribuons donc au fluorure l'absence de toute activité glucose-6-phosphatasique et glycolytique dans nos préparations, absence vérifiée expérimentalement comme nous le rapporterons plus loin.

On pourrait cependant faire une objection à l'emploi simultané du fluorure et du "système-piège" glucose-hexokinase. En effet, le fluorure est un inhibiteur de l'hexokinase, il pourrait donc empêcher le fonctionnement correct du "système-piège". Il n'en est cependant rien dans nos conditions d'incubation car Berger et coll. (1946) ont montré que les ions F^-, à des concentrations aussi élevées que 0,125 M (5 fois plus forte que celle que nous avons employée), n'inhibent pas l'hexokinase en présence d'un sel de magnésium 0,0065 M et de phosphate 0,001 M. Rien ne s'opposait donc à l'emploi simultané du fluorure et du "système-piège" glucose-hexokinase.

On remarque que notre milieu ne renferme aucun cofacteur. Or, de nombreux auteurs ont employé des cofacteurs, principalement du cytochrome c (Hunter 1955). Pour vérifier que, dans nos conditions, ce n'était pas nécessaire, nous avons comparé la consommation d'oxygène, la formation d'ATP et le rapport P/O d'homogénats de cerveau de Rat incubés en présence de succinate, avec ou sans FAD (Sigma grade II, 100 µg/fiole) et cytochrome c (Sigma type II, 500 µg/fiole). Les résultats, rapportés dans le tableau II, permettent de conclure qu'il n'y a aucune différence significative entre les incubations avec ou sans cofacteurs. Cette observation est en plein accord avec l'opinion de Potter (1957) qui signale, en décrivant un milieu optimum pour la mesure des rapports P/O, que l'addition de cytochrome c n'est pas essentielle. D'ailleurs, Green a constamment affirmé que même "les mitochondries, préparées avec des précautions suffisantes, ne requièrent que l'addition du substrat, du Pi, de l'ADP et la présence d'oxygène moléculaire" (Green et Fleischner 1960). Enfin, Aldridge (1957) avait montré que l'emploi de cofacteurs n'était pas utile avec son milieu d'incubation ni pour les mitochondries du cerveau ni pour celles du foie. Or notre milieu est très proche du sien.

Tableau II

Effets de l'adjonction de cofacteurs au milieu employé pour l'étude des phosphorylations oxydatives d'homogénats de cerveau de rat incubés en présence de succinate

Fioles	Quantités d'ATP formées en µmoles/fiole	Consommation d'oxygène en µatomes-g fiole	P/O
fioles sans cofacteurs	8,20	4,80	1,71
fioles avec 100 µg de FAD 500 µg de cyt. c	8,35	4,92	1,70

Nous employons une concentration 0,02 M en substrat au lieu de celle (0,01 M) qu'utilise Aldridge (1957) et que recommande Potter (1957). En effet, Greengard, Minnaert, Slater et Betel (1959) préconisent des concentrations élevées en substrat dans le cas du succinate car ils ont observé que la consommation d'oxygène augmente avec la concentration en substrat, même après

saturation de la succinodéhydrogénase. Comme la phosphorylation n'augmente pas dans les mêmes proportions, on observe un abaissement du rapport P/O, du moins avec certains tissus comme le foie. Or, Greengard et coll. ont montré qu'avec de basses concentrations en succinate, les étapes de dégradation postérieures au fumarate jouaient un rôle relativement plus important qu'avec les concentrations élevées. Cela expliquerait les phénomènes précédents. Ils conseillent donc d'employer des concentrations supérieures à 0,01 M ; c'est ce que nous avons fait.

On voit, enfin, que nous avons introduit de l'ATP dans notre milieu d'incubation. En effet, une inhibition de l'oxydation du succinate a été observée en l'absence de corps possédant des liaisons dites "riches en énergie" par Chance et Hagihara (1960) et par Klingenberg et Schollmeyer (1961). Or, elle est levée par l'ATP ou les systèmes générateurs d'ATP. L'E.D.T.A. est également un agent de stabilisation bien connu depuis les travaux de Cleland et Slater (1958). Son effet a été étudié récemment par Yang (1960).

Le milieu d'incubation que nous venons de décrire nous a toujours permis d'obtenir, aussi bien avec les homogénats de cerveau qu'avec les mitochondries isolées, des rapports P/O élevés, de l'ordre de ceux que l'on rencontre dans la littérature récente, tout en réalisant des conditions satisfaisantes pour l'étude d'un problème de neurochimie physiologique.

B - CHOIX DU PROCEDE EXPERIMENTAL GENERAL -

Nous exposerons et nous discuterons ici la manière dont nous avons conduit une expérience de mesure du rapport P/O. Pour cela, nous supposerons justifiée la méthode d'évaluation de la formation d'ATP d'après la quantité de Pi disparue du milieu.

1/ Description de la marche d'une expérience.

Il nous semble nécessaire de décrire d'une manière extrêmement précise ce processus expérimental car nous sommes convaincus que la standardisation maximum de la mesure du rapport P/O est souhaitable. En effet, la littérature reste trop souvent imprécise à ce sujet.

a) Préparation des fioles de Warburg.

Pour chaque homogénat et pour chaque préparation mitochondriale étudiés, nous avons toujours incubé huit fioles de Warburg réparties en deux séries. Les quatre fioles de la première série renfermaient 0,2 ml de NaOH à 10 p. cent dans le godet central, 2,3 ml du milieu d'incubation dans le compartiment principal et 0,3 ml de la solution d'hexokinase dans le bras latéral. Les quatre fioles de la deuxième série (fioles témoins) étaient préparées de la même manière, avec un milieu similaire mais dépourvu de succinate. Selon les recommandations de Potter (1957), les fioles étaient maintenues, pendant toute la préparation, dans un bain de glace, comme on doit le faire pour tout système renfermant de l'ATP. Des prises de 0,4 ml d'homogénat ou de suspension mitochondriale étaient alors introduites dans le compartiment principal et la fiole était immédiatement placée dans le bain-marie à 37°C.

b) Incubation.

Après 15 minutes d'équilibration thermique, nous faisions passer l'hexokinase du bras latéral dans le compartiment principal par renversement de la fiole. Les mesures de la respiration étaient alors effectuées pendant 30 minutes. Voici le détail des manipulations :

- Fioles avec succinate.

Deux d'entre elles étaient toujours sorties du bain-marie d'incubation dès la fin de la stabilisation thermique, après adjonction de l'hexokinase. 1 ml de leur contenu était, le plus rapidement possible, pipetté dans un tube contenant 9 ml d'eau déminéralisée glacée. Sur 1 ml de cette dilution, nous avons immédiatement effectué le dosage de Pi. Appelons A cette quantité de Pi. Pour les deux autres fioles avec succinate, nous avons ajouté l'hexokinase de la même façon, à la fin de la stabilisation thermique, puis nous avons mesuré la consommation d'oxygène pendant 30 minutes. Nous avons alors dosé le Pi résiduel. Soit B cette quantité.

- Fioles témoins.

Deux d'entre elles étaient bloquées à la fin de la stabilisation thermique et nous y avons dosé le Pi. Soit C cette quantité de Pi. Pour les deux autres, nous avons suivi pendant 30 minutes la consommation d'oxygène puis nous avons dosé le Pi résiduel. Soit D cette quantité.

c) Calcul du rapport P/O.

La différence A - B représente la quantité de Pi utilisé pendant les 30 minutes de respiration en présence de succinate. La différence C - D représente, quant à elle, la quantité de Pi utilisée, pendant le même temps et dans les mêmes conditions, en l'absence de ce substrat. La quantité de Pi disparue du milieu, en raison de l'utilisation du succinate, est donnée par l'expression :

$$(A - B) - (C - D)$$

De même, la consommation d'oxygène due à la seule utilisation du succinate, est obtenue par différence entre les consommations des deux séries de fioles.

On peut alors calculer le rapport P/O, c'est-à-dire le nombre d'atomes de Pi utilisé par atome d'oxygène consommé.

2/ Résultats expérimentaux.

Pour mettre en évidence la validité de ce mode opératoire, nous avons effectué une série d'expériences sur des homogénats de cerveau de Rat. Nous rapportons dans le tableau III les consommations d'oxygène et dans le tableau IV l'évolution des quantités de Pi présent dans le milieu pour les deux catégories de fioles.

3/ Discussion.

Les durées de stabilisation thermique et de mesure de la respiration ont été adoptées conformément aux conclusions de Slater et Holton (1954) qui ont montré les erreurs inhérentes à l'emploi de temps trop courts d'équilibration thermique suivis de trop brèves périodes d'observation de la respi-

ration. La plupart des auteurs laissent en présence, comme nous l'avons fait, les enzymes et le substrat étudié pendant la stabilisation thermique en plaçant l'hexokinase, seule ou avec le glucose, dans le bras latéral (Potter 1957 - Hunter 1955). Cette pratique est adoptée en raison de l'existence d'un effet protecteur du substrat, analogue à celui de l'ATP précédemment décrit. Ce fait classique (Hunter 1955) a été récemment confirmé par Klingenberg et Schollmeyer (1961).

Tableau III

Consommation d'oxygène d'homogénats de cerveau de rat incubés en présence de succinate

Fioles	Oxygène consommé en µatomes-g/fiole
Fioles témoins sans succinate	0,62
Fioles avec succinate	5,42
Différence due au succinate	4,80

Dans nos conditions d'incubation, on observe, même en l'absence de succinate, une certaine consommation d'oxygène. Elle représente environ 11 p. cent de la respiration mesurée en présence du substrat. Cette observation justifie l'emploi de fioles témoins, dont nous avons toujours tenu compte dans le calcul de la consommation d'oxygène. Cette consommation d'oxygène en l'absence de succinate représente uniquement la "respiration endogène". Nous montrerons en effet, ultérieurement, qu'il n'y a aucune utilisation aérobie du glucose présent dans le milieu, ni du G-6-P produit par le "système-piège".

Il existe également une certaine formation d'ATP en l'absence de succinate. Elle résulte aussi de l'utilisation des substrats endogènes, mais elle ne représente guère que 2 à 3 p. cent de la quantité produite en présence de succinate. La nécessité des fioles témoins est donc moins évidente à ce point de vue. Nous les avons cependant maintenues.

Remarquons, en conclusion, qu'en négligeant d'incuber des témoins, on commettrait une erreur de 3 p. cent par excès sur le numérateur et de 11 p. cent également par excès sur le dénominateur du rapport P/O, soit une sous-estimation de 8 p. cent de ce rapport, ce qui n'est pas négligeable.

C - CHOIX DE LA METHODE D'EVALUATION DE LA FORMATION D'ATP -

1/ Position du problème.

Lorsqu'on emploie une technique manométrique de détermination de la consommation d'oxygène, il y a trois méthodes classiques d'évaluation de la formation d'ATP.

La première consiste à doser le Pi du milieu. En effet, quels que soient les mécanismes intimes des phosphorylations oxydatives, - pour lesquels de nombreux schémas ont été proposés (Lehninger 1960) la réaction globale résumant la formation de l'ATP reste :

$$ADP + Pi \longrightarrow ATP$$

On peut admettre par conséquent, que la quantité de Pi disparue du milieu est équivalente à la quantité d'ATP formée.

La seconde méthode, utilisée par Slater en 1953, ne peut s'employer qui si le "système piège" glucose-hexokinase est présent dans le milieu. En effet, la réaction catalysée par l'hexokinase :

$$\text{glucose} + ATP \longrightarrow \text{G-6-P} + ADP$$

aboutit à la formation d'une quantité de G-6-P équivalente à celle de l'ATP néoformé. Or, on peut facilement doser le G-6-P, par exemple à l'aide de la technique enzymatique précédemment décrite. On admet, alors, que le G-6-P n'est pas un substrat utilisé par des réactions secondaires et qu'il reste intégralement dans le milieu d'incubation.

Une troisième méthode, due à Krebs et coll. (1953) repose sur des bases complètement différentes. Elle consiste à s'abstenir d'inhiber l'ATPase et à mesurer le "taux de renouvellement" de l'ATP en effectuant l'incubation en présence de ^{32}P et d'ATP initialement non radioactif. Il se produit en effet la réaction d'échange suivante aboutissant à un "marquage" de l'ATP :

$$^{32}P + ADP \rightleftharpoons ADP \sim {}^{32}P$$

Par des mesures de l'activité spécifique de l'ATP on peut, en appliquant les formules mathématiques établies par Krebs et coll. (1951 b) et par Stewart (1953), déterminer le "taux de renouvellement" et calculer le rapport P/O.

Nous avons renoncé à l'emploi de la méthode de Krebs car elle ne nous a pas paru adaptée à notre problème. En effet, elle n'est applicable qu'aux homogénats. Or, nous désirions faire porter nos recherches à la fois sur des homogénats et sur des mitochondries, sans modifier trop le processus expérimental pour comparer les résultats obtenus avec ces deux variétés de préparations chez les mêmes animaux. De plus, la température d'incubation assez basse (20°C) utilisée dans cette méthode pour freiner le renouvellement de l'ATP, et le rendre ainsi mesurable, s'écartait par trop des conditions physiologiques dans lesquelles nous désirions opérer.

2/ Résultats expérimentaux.

Pour choisir entre les deux autres méthodes, nous avons mesuré parallèlement à la consommation d'oxygène (tableau III) la disparition du Pi du milieu (tableau IV) et la formation du G-6-P (tableau V).

3/ Discussion.

On remarque d'abord qu'à la fin de la stabilisation thermique il y a, dans les fioles avec succinate, 5,33 µatomes-g de Pi de moins que dans les fioles témoins. Ceci est dû au fait que, pendant l'équilibration thermique, l'enzyme et le substrat sont en présence, l'hexokinase seule étant dans le bras latéral.

Tableau IV

Disparition du Pi du milieu au cours de l'incubation d'homogénats de cerveau de rat en présence de succinate

	Pi en µatomes-g/fiole		
	Fioles témoins sans succinate	Fioles avec succinate	Différence due au succinate
après 15 minutes de stabilisation thermique	18,77	13,44	5,33
après 30 minutes de respiration	18,61	5,08	13,53
quantité disparue pendant les 30 minutes de respiration	0,16	8,36	8,20

Tableau V

Formation du G-6-P au cours de l'incubation des homogénats de cerveau de rat en présence de succinate

	G-6-P en µmoles/fiole		
	Fioles témoins sans succinate	Fioles avec succinate	Différence due au succinate
après 15 minutes de stabilisation thermique	0,60	2,00	1,40
après 30 minutes de respiration	0,80	8,45	7,65
quantité apparue pendant les 30 minutes de respiration	0,20	6,45	6,25

A la fin de cette même période, on peut doser 0,6 µmole de G-6-P dans les fioles témoins. Une telle quantité ne saurait s'expliquer par le taux de G-6-P normalement présent dans le cerveau, donc dans l'homogénat avant toute incubation. En effet, la plupart des auteurs estiment qu'il y a, *in vivo*, 1 à 2 µmoles de G-6-P par g de cerveau frais chez le Rat (Abood et coll. 1952 - Le Page 1946 - Vladimirov et Ruebel 1957). Ceci correspondrait au plus à 0,1 µmole dans la prise d'homogénat que nous introduisons dans la fiole. En réalité, pendant toute la préparation de l'homogénat, il se produit une importante dégradation du G-6-P initialement présent dans le cerveau de l'animal. En effet, nous avons vérifié, par un dosage enzymatique, qu'il n'y en avait plus que 0,2 µmole par g de cerveau frais dans l'homogénat. Il n'y a donc que 0,01 µmole de G-6-P préexistant par fiole. Cet apport endogène étant négligeable, les 0,6 µmoles de G-6-P ont donc été produites à partir de l'ATP présent dans la fiole au moment de la constitution du "système-piège" par addition de l'hexokinase au milieu.

Cet ATP a trois origines, dont nous allons examiner l'importance relative :

- ATP préexistant dans le cerveau et introduit avec l'homogénat,

- ATP néoformé par la dégradation aérobie des substrats endogènes pendant les 15 minutes de stabilisation thermique.

- ATP entrant dans la constitution du milieu d'incubation (0,9 µmole par fiole).

Pour estimer la quantité d'ATP introduite avec l'homogénat, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Mandel et Harth (1961). Ces auteurs ont étudié l'influence du mode de prélèvement du cerveau sur la quantité d'ATP dosée dans cet organe chez le Rat non anesthésié. Ils ont montré qu'on trouvait 1,405 µmole d'ATP par g de P.F. après décapitation et congélation de la tête dans l'azote liquide avant dissection du cerveau, mais seulement 0,377 µmole si on disséquait le cerveau (20 sec.) avant la congélation dans l'azote liquide, enfin plus que 0,171 µmole en plongeant l'animal entier dans l'azote liquide, méthode ordinairement utilisée pour déterminer le taux d'ATP . Il est hors de doute qu'en l'absence de toute congélation brutale du cerveau, le taux d'ATP tombe bien au-dessous de cette dernière valeur. On peut donc l'estimer au plus à 0,034 µmole par fiole. Il intervient par conséquent pour une très faible part dans la formation des 0,6 µmoles du G-6-P.

La quantité d'ATP néoformé par l'utilisation des substrats endogènes, pendant les 15 minutes de stabilisation thermique, est certainement inférieure à 0,1 µmole. En effet, pendant les 30 minutes suivantes, à une température constante de 37°C, il ne s'en forme que 0,2 µmole. Nous pouvons donc conclure qu'au moins 0,5 sur les 0,6 µmoles de G-6-P dosées à la fin de la stabilisation thermique proviennent de l'ATP entrant dans la constitution du milieu d'incubation.

Comme le milieu d'incubation renfermait initialement 0,9 µmole d'ATP et qu'il n'en reste plus que 0,5 pour permettre la formation du G-6-P il faut donc admettre que 0,4 µmoles ont été détruites pendant l'équilibration thermique. Ceci nous indique que le KF à lui seul, ne suffit pas à inhiber entièrement l'ATPase et démontre l'utilité d'ajouter le "système-piège" à la fin de la stabilisation thermique. Ainsi se trouve vérifié le bien-fondé de l'utilisation simultanée de ces deux systèmes d'inhibition.

Nous constatons que les quantités de Pi disparues sont toujours très supérieures à celles de G-6-P formées. C'est ainsi qu'à la fin de la stabilisation thermique, 5,33 µatomes-g de Pi ont été utilisées dans les fioles avec succinate en plus de la quantité utilisée dans les fioles témoins. Or, nous ne dosons, dans les fioles avec substrat, que 1,40 µmole de G-6-P de plus que dans les fioles sans substrat. De même, après les 30 minutes de respiration, nous trouvons que 13,53 µatomes-g de Pi ont disparu du fait de l'utilisation du succinate, alors qu'il ne s'est formé que 7,70 µmoles de G-6-P. Ainsi, nous avons eu, pendant les 30 minutes de respiration, une différence entre les fioles avec substrat et les fioles témoins de :

13,53 - 5,33 = 8,20 µatomes-g de Pi disparu, et de

7,65 - 1,40 = 6,25 µmoles de G-6-P formé par le "système-piège"

Cette quantité de G-6-P formée est donc inférieure de 23,8 p. cent à celle de Pi disparue. En estimant la formation d'ATP par le dosage du G-6-P,

on aboutit par conséquent à un rapport P/O inférieur de 23,8 p. cent à celui obtenu par l'estimation de l'ATP au moyen de la disparition du Pi (tableau VI) .

Tableau VI

Comparaison des valeurs du rapport P/O des homogénats de cerveau de rat incubés en présence de succinate

Méthode d'estimation de la formation d'ATP	Quantités d'ATP formées en µ moles/fiole	Consommation d'oxygène en µatomes-g/fiole	P/O
Disparition du Pi	8,20	4,80	1,71
Formation du G-6-P	6,25	4,80	1,30

Ces constatations montrent qu'une partie du G-6-P formé a été dégradé. Il est bien évident qu'il ne saurait s'agir d'une hydrolyse par la glucose-6-phosphatase puisque celle-ci aurait fait apparaître une quantité de Pi égale à celle de G-6-P, ne créant ainsi aucune différence entre la quantité de G-6-P dosée et celle de Pi disparue du milieu. Il peut donc s'agir d'une dégradation suivant la voie de la glycolyse, ou bien suivant celle des pentoses, ou enfin suivant ces deux voies métaboliques.

Remarquons d'abord que, si la voie des pentoses intervient seule, il faut rejeter la méthode d'estimation de la formation d'ATP par le G-6-P et adopter l'évaluation par la quantité de Pi disparue. Par contre, si la glycolyse joue un rôle, il n'est pas possible d'adopter ce dernier procédé sans modification. En effet, cette voie utilise du Pi. Or, les quantités de G-6-P présentes en moyenne pendant les 30 minutes de mesure de la respiration, dans les fioles témoins et dans celles qui renferment du succinate, sont différentes. Ces quantités, données par la somme :

$$\text{G-6-P présent à la fin de la stabilisation thermique} + \frac{\text{G-6-P apparu en 30 minutes de respiration}}{2}$$

sont respectivement de 1 µmole et de 6,25 µmoles. Il faudrait donc apporter un correctif aux valeurs de Pi calculées par différence entre les fioles avec succinate et les fioles témoins, valeurs que nous avions attribuées jusqu'ici à la seule utilisation du succinate.

A priori, il est d'ailleurs peu probable que la voie glycolytique intervienne, en raison de la présence du fluorure inhibiteur de l'enolase. Néanmoins il nous a semblé que ce point méritait une étude expérimentale. Pour ce faire, nous avons ajouté à nos fioles témoins habituelles 8 µmoles de G-6-P. Nous avons alors mesuré simultanément la consommation d'oxygène, le Pi et le G-6-P. Les résultats sont rapportés dans le tableau VII.

Il y a bien effectivement dégradation du G-6-P, mais elle n'entraine aucune consommation d'oxygène et aucune disparition de Pi supplémentaire par rapport aux témoins ordinaires dépourvus de G-6-P. Les écarts constatés, respectivement 0,50 contre 0,62 µatome-g d'oxygène et 0,22 contre 0,16 µatome-g de Pi, sont de l'ordre des variations expérimentales.

Tableau VII

Résultats de l'incubation des homogénats de cerveau de rat en présence de 8 µmoles de G-6-P par fiole

	Pi en µatomes-g/fiole	G-6-P µmoles/fiole	Oxygène consommé en µatomes-g/fiole
Après 15 minutes de stabilisation thermique	18,80	2,70	
Après 30 minutes de respiration	18,68	3,00	0,50
Variation pendant les 30 minutes de respiration	0,22	0,30	0,50

Par conséquent, la différence de 23,8 p. cent trouvée entre le Pi disparu et le G-6-P produit lors des 30 minutes d'observation de la respiration est dûe à une dégradation d'une partie du G-6-P formé par la voie des pentoses, sans aucune utilisation de Pi. Lors du dosage du G-6-P par la G-6-P deshydrogénase, il n'a évidemment pas été possible de tenir compte du TPN réduit déjà formé par cette dégradation lors de l'incubation puisque celui-ci avait été détruit lors de la défécation acide des protéines.

D'autre part, ces expériences montrent que les homogénats, incubés dans nos conditions, ne manifestent aucune activité glucose-6-phosphatasique, car la dégradation de G-6-P mise en évidence précédemment ne s'accompagne pas d'une augmentation du taux du Pi présent dans le milieu. En effet il y a 18,61 µatomes-g de Pi à la fin de l'expérience dans les fioles incubées avec 8 µmoles de G-6-P et il y en a 18,68 dans les fioles témoins ordinaires. Or cette absence d'activité glucose-6-phosphatasique est, comme nous l'avons déjà signalé, la condition nécessaire à l'estimation correcte de la formation d'ATP par le dosage du Pi.

En conclusion, on voit que l'estimation de la synthèse d'ATP par le G-6-P formé au moyen du "système-piège" n'est pas une méthode valable pour les homogénats de cerveau incubés dans nos conditions. Elle aboutit en effet à une sous estimation très notable du rapport P/O, de l'ordre de 25 p. cent, car une partie du G-6-P produit est dégradée. Par contre, l'estimation de la synthèse d'ATP par le Pi disparu du milieu est parfaitement valable puisque la dégradation du G-6-P ne s'accompagne ni d'une consommation ni d'une libération de Pi.

D - EXPERIENCES D'INHIBITION SPECIFIQUE -

Pour vérifier que, dans nos conditions expérimentales, nous mesurions bien la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP liées à l'utilisation du succinate, nous acons effectué des expériences avec des inhibiteurs spécifiques de la succino-deshydrogénase d'une part, des phosphorylations oxydatives d'autre part.

1/ Inhibition de la succino-deshydrogénase par le malonate.

On sait, depuis les travaux classiques de Quastel et coll. (1928 et 1931) que le malonate est un inhibiteur spécifique de la succino-deshydrogénase. C'est l'exemple le plus typique d'inhibition compétitive par un analogue structural, que Thorn (1953) a étudié en détail.

Nous avons utilisé cet inhibiteur dans les conditions suivantes : nous incubions parallèlement :

- Une première série de fioles renfermant notre milieu ordinaire. 4 fioles contenaient du succinate et 4 autres n'en contenaient pas.

- Une deuxième série de fioles, renfermant ce même milieu d'incubation auquel nous avions ajouté du malonate de sodium 0,02 M (concentration finale). Là encore, 4 fioles contenaient du succinate et 4 autres n'en contenaient pas.

Nous donnons dans le tableau VIII les consommations d'oxygène et la formation d'ATP (évaluée d'après la disparition du Pi) dues à l'utilisation du succinate. La respiration est pratiquement nulle en présence de malonate et il ne s'effectue aucune synthèse d'ATP. Ceci montre bien que la formation d'ATP observée dans les fioles sans malonate est entièrement liée au fonctionnement des chaînes d'oxydation mitochondriales puisque en bloquant le transfert d'électrons nous avons supprimé toute phosphorylation.

Tableau VIII

Action du malonate sur les phosphorylations oxydatives des homogénats de cerveau de rat incubés en présence de succinate

Fioles	Quantités d'ATP formées en µmoles/fiole	Consommation d'oxygène en µatomes-g/fiole
Fioles sans malonate	8,50	4,60
Fioles avec malonate 0,02 M	nulle	0,11

2/ Découplage des phosphorylations oxydatives par le dinitrophénol.

A la suite des observations de Lardy et Elvehjem (1945) et de Clifton (1946), Loomis et Lipmann ont les premiers démontré en 1948 qu'en présence de dinitrophénol (DNP), la consommation d'oxygène observée en incubant des homogénats avec un substrat du cycle de Krebs, ne s'accompagnait plus d'une formation d'ATP. Ce phénomène est connu sous le nom de "découplage des phosphorylations oxydatives". Nous ne voulions pas entrer dans la discussion de son mécanisme sur lequel Slater (en publication) a fait une mise au point récente. Nous nous sommes donc borné à utiliser ce phénomène dont la réalité est actuellement bien établie.

Nous avons effectué, comme dans l'expérience précédente, des incubations parallèles avec notre milieu d'incubation ordinaire et avec ce même milieu renfermant en plus du 2-4-dinitrophénol 0,1 mM (concentration finale). Les consommations d'oxygène et les quantités d'ATP formées, dues à l'utilisation du succinate, sont rapportées dans le tableau IX.

Tableau IX

Action du dinitrophenol (DNP) sur les phosphorylations oxydatives des homogénats de cerveau de rat incubés en présence de succinate

Fioles	Quantités d'ATP formées en µmoles/fiole	Consommation d'oxygène en µatomes-g/fiole
Fioles sans DNP	9,00	4,35
Fioles avec DNP 0,1 mM	0,19	3,13

Le DNP supprime pratiquement toute synthèse d'ATP. On observe, de plus, une certaine inhibition de la respiration. Les auteurs ont obtenu à ce point de vue des résultats variés. Certains, comme Parker (1958), ont obtenu une augmentation de la respiration, d'autres rapportent qu'elle n'est pas affectée (Loomis et Lipmann 1948), d'autres enfin (Stanbury et Mudge 1954 Klingenberg et Schollmeyer 1961) ont décrit une inhibition de la consommation d'oxygène. Cette grande diversité est due à de petites différences dans les conditions expérimentales. De toutes façons, l'inhibition de la respiration n'est que de 28 p. cent alors que la phosphorylation est diminuée de 98 p. cent.

Cette expérience confirme bien que la formation d'ATP mesurée est entièrement liée à l'oxydation du substrat et aux phénomènes de transfert d'électrons puisque le DNP "découpleur vrai" (selon la définition de Racker, 1961) la rend pratiquement nulle.

E - DISCUSSION DU PROBLEME DE L'INHIBITION POSSIBLE DE LA SUCCINO-DEHYDROGENASE PAR L'OXALO-ACETATE -

On sait depuis les travaux de Das (1937) que l'oxalo-acétate peut inhiber la succino-dehydrogénase. Cet auteur a en effet montré, en utilisant la technique de Thunberg modifiée, que l'activité de cet enzyme isolé était inhibée de 50 p. cent par de l'oxalo-acétate 2×10^{-5} M avec une concentration en succinate 0,025 M. L'inhibition est bien plus importante qu'avec le malonate employé à concentration égale. Swingle, Axelrod et Elvehjem (1942), Pardee et Potter (1948), puis Tyler (1955) ont confirmé ce phénomène.

L'existence de cette inhibition pose un problème important à l'expérimentateur qui veut étudier "l'étape succinate-fumarate" du cycle de Krebs. En effet, une certaine quantité d'oxalo-acétate préexiste dans l'homogénat d'une part, et, d'autre part, il peut s'en former par dégradation du fumarate produit par la succino-dehydrogénase au cours de l'incubation.

Il convient donc de déterminer préalablement s'il existe réellement une inhibition due à l'oxalo-acétate dans les conditions choisies.

Il faut en effet noter que cette inhibition n'existe que dans certaines conditions, comme l'ont montré Pardee et Potter (1948). Ainsi, Das (1937) avait employé l'enzyme isolé et avait limité les réactions au transfert des hydrogènes du succinate à un accepteur non physiologique, le 2-6 dibromophénolindophénol. Pardee et Potter, de leur côté, ont retrouvé l'inhibition

dans un milieu très particulier contenant du $CaCl_2$ et du $AlCl_3$ et dépourvu de Mg^{++}. Dans ce milieu les homogénats ne peuvent oxyder ni le malate, ni le pyruvate, ni l'oxalo-acétate ; de plus, l'ATPase se trouve stimulée par les ions ca^{++}. Pardee et Potter ont qualifié eux-mêmes ce milieu de "non physiologique".

Ces auteurs ont donc repris l'étude de l'inhibition dans les milieux qu'ils appellent "physiologiques", du même type que le nôtre. Ils ont alors constaté, avec toute une gamme de concentration en oxalo-acétate, qu'en présence d'ATP et de Mg^{++} il n'y avait aucune inhibition de la succinodeshydrogénase. Tyler (1955) a confirmé ce fait et observé en outre que l'EDTA renforçait cette protection. Rappelons à ce propos que nous avons déjà signalé l'effet protecteur de l'ATP, des systèmes générateurs d'ATP et de l'EDTA (cf. supra) contre l'inactivation spontanée de la succino-dehydrogénase et la succinoxydase, observée lors d'une préincubation en l'absence de composés "riches en énergie". Certains auteurs avaient attribué cette inactivation à l'oxalo-acétate mais ceci a été très contasté (Ernster en publication - Schollmeyer et Klingenberg, 1961) mais aucun autre mécanisme satisfaisant n'a été proposé. Nous n'avons pas voulu entrer dans cette discussion puisque nous avions choisi des conditions dans lesquelles cette inactivation spontanée ne se produisait pas.

Nous pouvons donc conclure de l'examen des travaux précédents qu'une inhibition de la succino-deshydrogénase ne peut pas se manifester dans nos conditions. Cependant un second problème se pose au sujet de l'oxalo-acétate éventuellement présent dans notre milieu. Nous sommes, en effet, dans des conditions où cet oxalo-acétate peut être un substrat. Son utilisation peut donc aboutir à une consommation d'oxygène et à une formation d'ATP interférant avec celles dues au succinate.

Certes, nous éliminions à l'aide des fioles témoins la perturbation que pourrait introduire de ce point de vue l'oxalo-acétate endogène. Ce dernier est d'ailleurs pratiquement négligeable (Ernster, en publication). Il reste l'oxalo-acétate produit, lors de l'incubation, dans les fioles avec succinate par les étapes de dégradation postérieures au fumarate. Certes, nous avons cherché à réduire le rôle de ces réactions secondaires en nous repprochant des conditions préconisées par Greengard, Minnaert, Slater et Betel (1959) (cf. supra) mais nous avons pensé que ce point méritait une étude expérimentale.

Nous avons tout d'abord incubé nos homogénats avec de l'oxalo-acétate (Sigma) 4×10^{-4}M. Les résultats obtenus (tableau X) montrent qu'effectivement ce substrat peut être utilisé dans notre milieu, ce qui est en plein accord avec les travaux de Potter, Pardee et Lyle (1948). Notons que son utilisation aboutit à une formation d'ATP très modérée par rapport à la quantité d'oxygène consommée. Nous avons alors incubé cette même quantité d'oxalo-acétate en présence de succinate (concentration habituelle). L'utilisation simultanée des deux substrats aboutit (tableau X) à une consommation d'oxygène légèrement supérieure à celle observée en présence de succinate seul. Cette consommation d'oxygène reste cependant inférieure à la somme des respirations mesurées avec les deux substrats séparés. Ce fait a déjà été constaté par Pardee et Potter (1948). On peut faire la même observation sur les quantités d'ATP formé. Ces faits sont classiques, mais restent à expliquer. Quoi qu'il en soit, du point de vue pratique, ces expériences soulignent bien la nécessité d'éliminer les réactions secondaires auxquelles l'oxalo-acétate éventuellement formé à partir du succinate pourrait donner lieu.

Tableau X

Action de l'oxalo-acétate sur les phosphorylations oxydatives des homogénats de cerveau de rats incubés en présence de succinate

Fioles	Quantités d'ATP formé en µmoles/fiole	Consommation d'oxygène en µatomes-g/fiole	P/O
Fioles avec succinate	8,20	4,80	1,71
Fioles avec oxalo-acétate 4×10^{-4} M	0,60	2,13	0,28
Fioles avec succinate oxalo-acétate 4×10^{-4} M	6,64	5,00	1,32
Fioles avec succinate + cystéine-sulfinate 0,004 M	8,30	4,90	1,73

Pour montrer que, dans nos expériences, aucune de ces réactions secondaires n'avait d'importance quantitative, nous avons incubé des homogénats de cerveau de Rat dans nos conditions habituelles (une série de fioles témoins, une série de fioles avec succinate) en ajoutant au milieu du cystéine-sulfinate de sodium 0,004 M. Les résultats rapportés dans le tableau X montrent que l'addition de ce corps au milieu ne provoque aucun changement ni de la consommation d'oxygène, ni de la formation d'ATP, ni du rapport P/O.

Or, Singer et Kearney (1956) ont montré qu'il existait dans les tissus animaux un système enzymatique susceptible de catalyser une réaction de transamination entre le cystéine-sulfinate et l'oxalo-acétate :

Cystéine-sulfinate + oxalo-acétate ⟶ sulfinylpyruvate + aspartate.

Cette réaction, en présence d'un excès de cystéine-sulfinate, aboutit à une élimination de l'oxalo-acétate présent dans un milieu d'incubation. Ce fait a été confirmé récemment par Klingenberg et Schollmeyer (1961) et par Ernster (en publication). Par conséquent, si de l'oxalo-acétate se formait à partir du succinate lors de nos incubations, il aurait été éliminé et sa disparition aurait entraîné des modifications de la consommation d'oxygène, de la formation d'ATP et du rapport P/O. Nous pouvons donc conclure de ces expériences qu'il ne s'en forme pas, du moins pas en quantité suffisante pour donner lieu à une consommation d'oxygène et à une formation d'ATP décelables avec nos techniques.

En résumé, nous pouvons considérer que l'oxalo-acétate endogène et celui qui se forme éventuellement par une dégradation du succinate ultérieure au fumarate ne produisent, dans nos conditions d'incubation, ni inhibition de la succino-dehydrogénase ni réactions secondaires gênantes. Il ne nous a donc pas paru nécessaire d'ajouter à notre milieu du cystéine-sulfinate d'une manière systématique, comme l'ont fait Fletcher, Myant et Tyler (1962).

CHAPITRE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX OBTENUS AVEC DIVERS GROUPES D'HOMÉOTHERMES ET D'HIBERNANTS ET DISCUSSION DE CES RÉSULTATS

Nous avons mesuré, pour divers groupes d'homéothermes et d'hibernants, la formation d'ATP, la consommation d'oxygène et le rapport P/O en présence de succinate, de trois types différents de préparations :

- homogénats de cerveau,
- mitochondries de cerveau isolées,
- homogénats de myocarde ventriculaire.

Nous envisagerons successivement les résultats obtenus avec ces trois types de préparations.

A - RESULTATS OBTENUS AVEC LES HOMOGENATS DE CERVEAU -

Ces résultats figurent respectivement dans les tableaux XI et XII pour les cinq séries d'homéothermes et pour les quatre séries d'hibernants étudiés.

Tableau XI

Consommation d'oxygène, formation d'ATP et rapport P/O d'homogénats de cerveau d'homeothermes incubés en présence de succinate

Animaux étudiés	Nombre d'animaux	Formation d'ATP µmoles/g de P.F./h	Consommat. d'oxygène µatomes-g/g de P.F./h	P/O
Rats	6	328 ± 26	192 ± 21	1,71 ± 0,11
Cobayes	5	338 ± 19	191 ± 14	1,77 ± 0,18
Rats acclimatés à 7°C	6	332 ± 23	208 ± 10	1,60 ± 0,12
Rats narcotisés atropinés et mis en hypothermie artificielle	5	365 ± 52	214 ± 23	1,70 ± 0,17
Rats narcotisés atropinés et laissés à une température centrale normale	5	353 ± 25	200 ± 19	1,76 ± 0,14

Tableau XII

Consommation d'oxygène, formation d'ATP et rapport P/O d'homogénats de cerveaux d'hibernants incubés en présence de succinate

Animaux étudiés		Nombre d'animaux	Formation d'ATP µmoles/g de P.F./h	Consommat. d'oxygène µatomes-g/g de P.F./h	P/O
Animaux d'hiver	Hamsters d'hiver réveillés (temp. centr. 37°C)	4	440 ± 29	266 ± 18	1,65 ± 0,13
	Hamsters d'hiver endormis (temp. centr. 5 à 7°C)	4	484 ± 45	264 ± 16	1,83 ± 0,16
	Spermophiles d'hiver réveillés (temp. centr. 37°C)	5	526 ± 49	314 ± 29	1,67 ± 0,20
Animaux d'été	Hamsters d'été (temp. centr. 37°C)	8	428 ± 51	201 ± 29	2,12 ± 0,16

Nous allons effectuer trois séries de comparaisons :

- Comparaison des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau d'homéothermes.

- Comparaison des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau d'hibernants.

- Comparaison des résultats trouvés pour les deux catégories d'animaux.

Dans chaque comparaison, nous aurons à envisager successivement trois points de vue :

- la consommation d'oxygène,

- la formation d'ATP,

- le rapport P/O.

L'analyse statistique sera effectuée par analyse de variance pour les deux premiers points et par analyse de covariance pour le dernier. Nous avons vérifié à l'aide du test de Bartlett que les variances sont homogènes (tableau XIII).

Tableau XIII

Interprétation statistique des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau

Analyse de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett

Résultats expérimentaux analysés	Résultats du test de Bartlett		
	χ^2	Σ dl	p
Consommation d'oxygène	9,70	39	> 0,05
Formation d'ATP	11,86	39	> 0,05

1/ Comparaison des résultats obtenus chez les homeothermes dans diverses circonstances expérimentales.

Les comparaisons effectuées et leurs résultats statistiques figurent dans les tableaux XIV et XV. Nous allons examiner successivement, la valeur du rapport, le problème des variations inter-spécifiques, celui de l'effet de la narcose barbiturique, celui de l'effet de l'hypothermie expérimentale et enfin celui de l'effet de l'acclimatation au froid.

a) Ecart entre la valeur théorique et la valeur mesurée du rapport P/O.

Nous avons mesuré des rapports P/O moyens de 1,71 pour les homogénats de cerveau de Rat et de 1,77 pour ceux de cerveau de Cobaye. Or, le rapport P/O théorique actuellement admis pour "l'étape succinate-fumarate" du cycle de Krebs est 2 (Morrison 1961). On pense, en effet, qu'au cours des phénomènes de transfert d'électrons au niveau des chaînes mitochondriales, il se forme une première molécule d'ATP pendant le transfert entre le succinate et le cytochrome c (Greengard, Minnaert, Slater et Betel 1959) et une seconde pendant le transfert entre ce dernier et l'oxygène (Jacobs et Sanadi 1960 - Morrison, Hollocher et Stotz 1961).

Cette valeur théorique ne représente cependant que le rendement maximum possible du système, c'est-à-dire le degré maximum de "couplage" des phosphorylations et des oxydations. Les valeurs expérimentales, quant à elles, traduisent le rendement statistique moyen d'une préparation tissulaire donnée. On constate qu'elles sont généralement inférieures à la valeur théorique (Hunter 1955). Cette différence peut être due à deux ensembles de facteurs, d'une part aux conditions expérimentales employées pour la mesure, d'autre part à des effets que nous qualifions de "physiologiques". Il peut s'agir de phénomènes intervenant à l'échelle des structures subcellulaires, cellulaires ou à l'échelle d'un organe ou même d'un organisme entier. L'ensemble de ces facteurs est responsable des résultats différents obtenus, avec un même substrat et dans des conditions expérimentales similaires, suivant le tissu étudié et son état physiologique.

Ainsi, Slater et Cleland (1953) trouvent un rapport P/O de 1,70 environ pour les mitochondries du foie, rapport voisin de celui obtenu par Krebs et Coll. (1953) avec des homogénats de foie et par Copenhaver et Lardy (1952) avec des mitochondries isolées. Cette valeur a été souvent confirmée depuis

(Panogos, Beyer et Masoro 1958 - Hannon 1959 - Jacobs et Crane 1960). Or, Slater et Cleland (1953) ont obtenu constamment des valeurs de l'ordre de 1 avec des sarcosomes en opérant dans les mêmes conditions qu'avec les mitochondries de foie.

En plus de ces différences topographiques, il est hors de doute qu'un grand nombre de régulations peuvent s'exercer au niveau des mitochondries, entre autres des influences hormonales faisant varier pour un même tissu le degré de"couplage" suivant les circonstances physiologiques (cf. infra).

Nous pensons que nos valeurs expérimentales, qui sont reproductibles et qui ne s'éloignent pas trop des valeurs théoriques peuvent être utilisées dans une étude de neurochimie comparée dont le but est d'apprécier le degré de "couplage" des phosphorylations et des oxydations existant *in vivo*. Remarquons en effet que notre méthode nous a permis d'obtenir, en opérant pourtant dans les mêmes conditions, des rapports P/O nettement supérieurs chez les hibernants sacrifiés en été. De plus, nous verrons ultérieurement que les mesures effectuées avec les mitochondries isolées nous ont donné des valeurs très proches de celles obtenues avec les homogénats. Nous comparerons à ce propos ces valeurs avec celles de la littérature.

Tableau XIV

Interprétation statistique des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau :

Comparaisons par analyse de variance de la consommation d'oxygène et de la formation d'ATP des divers groupes d'homéothermes

Groupes comparés		Consommation d'oxygène		Formation d'ATP	
		F	p	F	p
Rats	Cobayes	0,004	> 0,05	0,18	> 0,05
Rats	Rats ayant vécu à 7°C	1,66	> 0,05	0,03	> 0,05
Rats	Rats narcotisés atropinés et laissés à une température centrale normale	0,36	> 0,05	1,12	> 0,05
Rats	Rats narcotisés atropinés et mis en hypothermie	2,91	> 0,05	2,52	> 0,05
Rats narcotisés atropinés et mis en hypothermie artificielle	Rats narcotisés atropinés et laissés à une température centrale normale	1,12	> 0,05	0,25	> 0,05

Pour toutes les comparaisons figurant dans ce tableau,

$$Dl_{\epsilon} = 1 \quad \text{et} \quad dl_{I} = 39.$$

Tableau XV

Interprétation statistique des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau :

Comparaison par analyse de covariance des rapports P/O des divers groupes d'oméothermes

Groupes comparés		dl_f	dl_t	F	P
Rats	Cobayes	8	1	0,64	> 0,05
Rats	Rats ayant vécu à 7°C	9	1	0,69	> 0,05
Rats	Rats narcotisés atropinés et laissés à une température centrale normale	8	1	0,12	> 0,05
Rats	Rats narcotisés atropinés et mis en hypothermie artificielle	8	1	0,12	> 0,05
Rats narcotisés atropinés et mis en hypothermie artificielle	Rats narcotisés atropinés et laissés à une température centrale normale	7	1	0,07	> 0,05

b) Absence de variations interspécifiques des phosphorylations oxydatives cérébrales.

Comme le montre le tableau XI, la consommation d'oxygène, la formation d'ATP et le rapport P/O sont très voisins pour les homogénats de cerveau de Rat et de Cobaye. Cette absence de variation interspécifique, confirmée par l'étude des mitochondries, nous a permis de grouper les deux espèces en un seul ensemble pour effectuer certaines comparaisons avec les hibernants (cf. infra).

Rappelons que certains auteurs russes (5ème Congrès International de Biochimie, Moscou 1961) considèrent que les rapports P/O ont augmenté progressivement, dans le cerveau, au cours de l'évolution des vertébrés et qu'il n'y a pas de variations interspécifiques notables dans la classe des mammifères, où l'on rencontre les valeurs les plus élevées. Nos expériences semblent confirmer ce point de vue, mais il faut remarquer que le petit nombre d'espèces étudiées par ces auteurs, ainsi que la méthode de détermination d'un rapport P/O "global" *in vivo* qu'ils ont employée, ne permettent pas de souscrire sans réserve à leur opinion.

c) Absence de modifications des phosphorylations oxydatives cérébrales dans la narcose aux barbituriques.

Nous avons sacrifié une série de rats trois quarts d'heure après narcose au nembutal et injection d'atropine pour comparer leurs phosphorylations oxydatives à celles des rats traités de la même manière mais mis ensuite en hypothermie expérimentale. Or, il est intéressant de noter que les homogénats

de cerveau de ces rats narcotisés et ayant reçu de l'atropine ont des rapports P/O très voisins de ceux de rats normaux et ne présentent aucune inhibition de la respiration ni de la formation d'ATP mesurées en présence de succinate.

Notons que l'influence des barbituriques sur les phosphorylations oxydatives cérébrales a été très souvent étudiée *in vitro*. Après les publications initiales de Jowett et Quastel (1937), celles de Brody et de Bain (Brody et Bain 1951 - Bain 1952 - Brody, Bain et Hurwitz 1954 - Brody 1955) ont montré que les barbituriques inhibent la consommation d'oxygène mais plus encore la phosphorylation des préparations de cerveau incubées en présence de pyruvate, alors qu'aucune modification n'est observée en présence de succinate. L'inhibition des oxydations et l'effet "découplant" aboutiraient, selon ces auteurs, à une forte diminution de la production d'ATP, qui tomberait à un taux inférieur au taux nécessaire au maintien de la fonction, entraînant ainsi l'hypnose. Aldridge et Parker (1960) ont repris cette question et ont observé une inhibition de la respiration mais aucun "découplage" avec les barbituriques ajoutés *in vitro* aux préparations sauf avec les thiobarbituriques. Ils ont confirmé que "l'étape succinate-fumarate" du cycle citrique n'est sensible à aucun de ces anesthésiques.

Il est extrêmement difficile de comparer les expériences réalisées *in vitro* à celles effectuées avec des préparations d'animaux narcotisés. Il ne semble pas possible, à l'heure actuelle, d'attribuer l'action dépressive des barbituriques à une inhibition des phosphorylations oxydatives telle qu'elle a été observée *in vitro* (Heald 1960).

D'ailleurs, des travaux effectués au cours de ces dernières années ont montré qu'il n'existe aucun changement dans la quantité et la répartition des nucléotides libres, en particulier des nucléotides adényliques, au cours de la narcose aux barbituriques ou à divers anesthésiques (Mandel et Harth 1960 et 1961 - Minard et Davis 1962). Ceci prouve bien qu'en tout cas *in vivo* et aux doses employées, les phosphorylations oxydatives ne sont pas affectées (Mandel et Weill 1962).

Nos résultats viennent confirmer cette opinion puisqu'ils montrent que "l'étape succinate-fumarate" et la production d'ATP qui l'accompagne ne sont pas modifiées lors de la narcose au nembutal. Rappelons à ce propos que, dès 1943, à la suite d'expériences faites *in vitro*, Soskin et Taubenhaus avaient proposé l'emploi du succinate comme analeptique dans l'intoxication barbiturique. Des résultats très variés ont été obtenus, comme l'ont rapporté Weil-Malherbe (1955) et Quastel (1955). L'intégrité de la succino-oxydase cérébrale que nous avons observée dans l'hypnose barbiturique pourrait apporter une justification théorique à ce traitement, mais il faudrait que la restauration de l'ATP cérébral, hypothèse de départ de cette thérapeutique, trouve sa justification.

Notons enfin que l'atropine, qui possède une action centrale en plus de son activité vagolytique périphérique et qui est souvent employée comme prémédication à l'anesthésie, ne modifie pas plus que les barbituriques l'utilisation cérébrale du succinate et les phosphorylations qui en découlent.

d) Absence de modifications des phosphorylations oxydatives cérébrales dans l'hypothermie expérimentale.

Nous constatons qu'une hypothermie profonde et prolongée, qui entraîne une suppresion totale de l'activité électro-corticale (Kayser 1955a et 1958 -

Kayser et Hiebel 1952), n'influence pas les phosphorylations oxydatives mesurées *in vitro* à 37°C. En effet, le système de la succinoxydase du cerveau des animaux refroidis, n'est pas perturbé, ni par rapport à celui des animaux témoins narcotisés et atropinés, ni par rapport à celui des rats non traités.

A notre connaissance, il n'existe aucune étude antérieure de ce complexe enzymatique cérébral dans l'hypothermie. Toutefois, Boffi et Coll. (Boffi et Massimo 1958 - Boffi, Fazzini et Massimo 1958) ont mesuré l'activité succino-deshydrogénasique à 38°C, par une technique employant des sels de tétrazolium, dans des coupes de myocarde de rats mis en hypothermie après anesthésie. Lorsque la température centrale atteint 30°C, on ne note aucune modification, mais à 25°C, il se produit une nette diminution de l'activité succino-déshydrogénasique (Boffi et Massimo 1958). Enfin, à 10°C, survient l'arrêt cardiaque. Or, 30 minutes après cet arrêt, l'activité enzymatique est environ deux fois plus forte que celle des rats normaux (Boffi, Fazzini et Massimo 1958). Ces auteurs n'ont cependant pas étudié les phosphorylations. Leurs résultats diffèrent des nôtres dans la mesure où nous n'avons pas trouvé de modification de la consommation d'oxygène.

Il peut s'agir évidemment d'une spécificité d'organe, l'hypothermie n'ayant pas les mêmes effets au niveau du cerveau et du myocarde. Nous ne pouvons cependant pas l'affirmer car Boffi et Coll. n'ont pas étudié l'effet de l'hypothermie en elle-même. Ils n'ont pas éliminé l'influence de l'anoxie puisque c'est après 30 minutes d'arrêt cardiaque qu'ils ont testé l'activité de l'enzyme. Or, nous avons pris soin dans notre travail de maintenir une bonne oxygénation cérébrale par la respiration artificielle au carbogène et de sacrifier l'animal dès l'apparition des premiers troubles cardio-vasculaires importants (cf. supra). Il est donc possible que l'hypothermie en elle-même n'aie pas plus d'effet sur la succino-déshydrogénase myocardique qu'elle n'en a sur celle du cerveau.

Si les mécanismes aboutissant à la formation d'ATP n'ont pas été étudiés jusqu'alors dans le cerveau lors de l'hypothermie profonde, les variations de la quantité globale d'ATP du tissu nerveux ont été, par contre, l'objet de nombreux travaux (Vladimirov 1959 - Vysotskaya 1959 - Shtutman 1959 - Kuhn et Coll. 1959 - Nechaeva 1961). Tous les auteurs qui trouvent des changements du taux d'ATP, comme Vysotskaya (1959), n'ont pas éliminé l'influence de l'anoxie. Or, on sait que l'hypoxie et l'anoxie aboutissent à une chute de la quantité d'ATP cérébral (Mandel et Weill 1962).

D'ailleurs, Vladimirov (1959) a réussi à bien dissocier l'influence respective de l'anoxie et de l'hypothermie chez le lapin refroidi jusqu'à 20°C. Or, en l'absence d'anoxie, il n'a trouvé aucune altération de la quantité d'ATP cérébral ; par contre, un arrêt circulatoire produit une chute rapide de la quantité d'ATP. Nechaeva (1961) a obtenu des résultats analogues chez le chat mis en hypothermie à 14°C, ainsi que Savchenko (1958) chez le lapin en hypothermie à 20°C et que Kuhn et Coll. (1959) chez le chien refroidi à 20°C. Il est intéressant de noter que la chute d'ATP due à l'anoxie est cependant moindre en hypothermie qu'à une température centrale normale (Thorn et Coll. 1958 - Vladimirov 1959 - Samson et Coll. 1959 - Isselhard et Coll. 1959). L'ensemble de ces travaux justifie pleinement les précautions que nous avons prises pour éviter l'anoxie.

Nos résultats permettent de rendre compte, dans une certaine mesure, du fait que l'hypothermie en elle-même ne provoque pas de variation de la teneur en ATP du cerveau. En effet, nous n'avons trouvé aucune modification

d'un des systèmes producteurs d'ATP, "l'étape succinate-fumarate du cycle citrique, testé à 37°C. Cela peut signifier que les mécanismes régulateurs de type hormonal mis en jeu *in vivo* par l'hypothermie (Kays 1957b), n'exercent aucune influence sur ce point du métabolisme cérébral.

Devant les faits que nous venons de discuter, on peut admettre que, pendant l'hypothermie, parallèlement à une réduction de la production d'ATP due simplement à l'abaissement de la température, l'utilisation des "liaisons riches en énergie" est elle aussi diminuée, ce qui aboutit au maintien du taux global de l'ATP cérébral.

Ayant ainsi montré qu'en l'absence de toute lutte contre le froid, l'hypothermie n'entraîne aucune modification d'ordre physiologique des phosphorylations oxydatives cérébrales des homéothermes, il nous a semblé intéressant d'étudier ces dernières dans la lutte contre le froid.

e) Absence de modifications des phosphorylations oxydatives cérébrales chez des homéothermes acclimatés à une ambiance froide.

Les animaux que nous avons étudiés avaient tous séjourné longtemps à basse température (8 à 12 jours à 7°C). Ils présentaient donc des "réactions d'adaptation" au froid et non pas des réactions thermorégulatrices à court terme.

Nous n'avons constaté, là encore, aucune modification, ni de la consommation d'oxygène, ni de la quantité d'ATP formé, ni du rapport P/O pour des homogénats de cerveau de rats ayant ainsi vécu dans une ambiance froide. Avant de proposer une interprétation de ces résultats, il nous paraît nécessaire de rappeler un certain nombre de données antérieures.

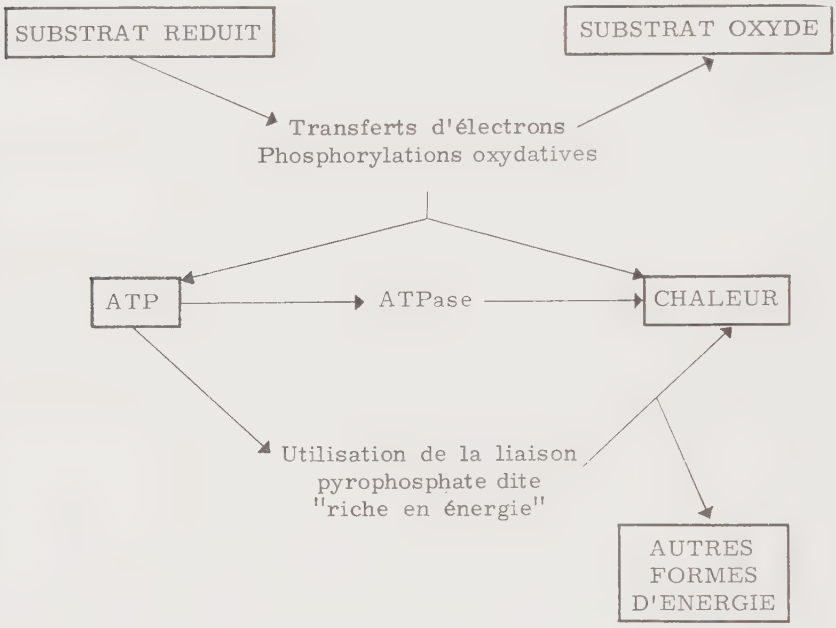
En premier lieu, les travaux de nombreux physiologistes comme Gelineo (1934), Kayser (1937), Sellers et Coll. (1951), Page et Chenier (1953), Cottle et Carlson (1956), Fuhrman et Fuhrman (1959), tendent à montrer qu'il existe, à l'échelle cellulaire une augmentation de la consommation d'oxygène chez les animaux homéothermes exposés et acclimatés au froid (Smith et Hoijer 1962). D'autre part, les revues récentes de Hannon (1960), Beyer (1960), Smith (1960) et de Smith et Hoijer (1962), font le bilan des travaux effectués sur l'activité de diverses oxydases spécifiques et sur l'intensité des phosphorylations oxydatives dans différents tissus d'animaux "adaptés" au froid. Or, les travaux rapportés ont été réalisés presque exclusivement sur le foie et sur le muscle strié et plus accessoirement sur le myocarde.

Il nous semble que deux groupes de faits concernant "l'étape succinate-fumarate" du cycle de Krebs ont été bien établis :

- D'une part, "l'adaptation" au froid a pour conséquence une augmentation de l'activité succino-déshydrogénasique et succinoxydasique dans le foie et le muscle (You et Sellers 1951 - Clark et Coll. 1954 - Desmarais 1954 - Hannon 1958 et 1960). Il s'agirait, selon Hannon (1960), à la fois de la révélation d'une activité enzymatique latente et d'une augmentation absolue du taux de la deshydrogénase dans les mitochondries.

- D'autre part, il se produit un "découplage" des phosphorylations oxydatives dans ces mêmes tissus (Panagos, Beyer et Masoro 1958 - Panagos et Beyer 1958 et 1959 - Hannon 1959 et 1960 - Beyer 1960). L'abaissement du rapport P/O a été observé à la fois avec des homogénats et avec des mitochondries isolées. Mais, d'après les expériences de Smith (1960) qui a notamment soumis les mitochondries à des lavages répétés, le "découplage" pourrait être dû à un facteur extra-mitochondrial.

Si nous comparons nos résultats à ceux des auteurs précédents, il faut admettre que les modifications enzymatiques observées dans les tissus hépatique et musculaire strié ne se produisent pas dans le cerveau. Ce fait nous paraît avoir une signification physiologique. En effet, les modifications précédemment décrites dans le foie et le muscle aboutissent à une augmentation de la thermogenèse (Hannon 1960 - Beyer 1960 - Smith 1960 - Smith et Hoijer 1962) comme l'indique le schéma suivant :



Signalons, par ailleurs, que d'autres mécanismes d'intensification de la thermogenèse peuvent exister, comme l'ont suggéré Potter (1958), Smith (1958) et Hoijer (1960) :

- Soit l'utilisation plus importante d'une "voie non phosphorylante" du transfert d'électrons impliquant la TPNH-cytochrome c-réductase initialement décrite par Kaplan (1956).

- Soit un transfert plus intense par des "chaînes" comprenant l'acide ascorbique (Hoijer 1960). Ces chaînes ont en effet un rapport P/O très faible (Lehninger et Coll. 1954 - Kielley et Bronk 1957).

En fait, ces deux dernières possibilités reposent encore sur des bases expérimentales peu nombreuses (cf. Smith et Hoijer 1962 - Skulachev et Maslov 1961 - Skulachev, en publication). Aussi, à l'heure actuelle, admet-on que le "découplage" des phosphorylations oxydatives et l'intensification du transfert par les chaînes mitochondriales classiques (et peut-être aussi l'augmentation de l'activité ATPasique) représentent le mécanisme cellulaire essentiel de l'augmentation de la thermogenèse survenant dans les ambiances froides.

Il n'est donc pas étonnant de rencontrer ces modifications dans les tissus qui, précisément, jouent un rôle de premier plan dans le métabolisme énergétique de l'organisme ("metabolizing mass" des auteurs anglo-saxons), tels que le muscle et le foie (Potter 1958).

Par contre, dans le cerveau et sans doute dans d'autres organes, où le taux d'ATP est essentiel au maintien de la fonction, maintien qui conditionne la survie de l'organisme, les modifications précédentes ne se produisent pas. Telle nous paraît être la signification physiologique de la différence entre nos résultats et ceux des auteurs qui ont étudié des préparations hépatiques et musculaires. Il serait évidemment nécessaire, pour vérifier cette hypothèse, d'étudier d'autres étapes oxydatives du métabolisme cérébral. Il faudrait en outre faire le bilan des quantités et de la répartition des nucléotides du cerveau d'homéothermes placés dans des ambiances froides.

Il nous semble que la variation métabolique que nous venons d'observer entre le cerveau et d'autres organes comme le foie et le muscle peut s'expliquer par une différence de sensibilité des récepteurs périphériques envers les hormones. En effet, la plupart des auteurs admettent que les modifications enzymatiques mises en évidence dans le foie et le muscle sont dues à une augmentation de la sécrétion thyroïdienne provoquée par le froid. Cette interprétation repose sur les constatations expérimentales suivantes :

- L'activité thyroïdienne est plus élevée chez les animaux acclimatés à une ambiance froide (Leblond et Gros 1943 - Dempsey et Astwood 1943 - Sellers et You 1950 - Cottle et Carlson 1956 - Woods et Carlson 1956).

- L'injection d'hormones thyroïdiennes à des animaux normaux produit les mêmes effets que l'ambiance froide (Martius et Hess 1951 - Hoch et Lipman 1954 - Maley et Lardy 1955 - Smith 1960).

- Les hormones thyroïdiennes ajoutées *in vitro* aux préparations tissulaires réalisent les mêmes modifications (Maley et Lardy 1953 - Hoch et Lipmann 1954 - Tapley et Cooper 1956 - Bronk 1960).

En fait, cette interprétation sera certainement précisée à la lumière des travaux récents de Dallam et Coll. (Dallam et Reed 1960 - Dallam et Howard 1960) et de Fletcher et Coll. (1962) qui ont bien montré la variation des effets des hormones thyroidiennes sur les phosphorylations oxydatives *in vivo* et *in vitro* suivant la concentration de ces hormones. En effet, à faible dose, ces hormones pourraient soit stimuler les phosphorylations sans modifier les oxydations, augmentant ainsi le rapport P/O (Dallam et Coll.), soit stimuler à la fois les phosphorylations et les oxydations sans modifier le rapport P/O (Fletcher). Par contre, à plus forte dose, elles ont un effet "découplant".

Quoi qu'il en soit, le rôle des hormones thyroïdiennes est, de l'avis général, très important dans les modifications enzymatiques des tissus hépatique et musculaire précédemment décrits. Or, en 1957, Weiss a étudié comparativement la réponse de différents tissus à la thyroxine, à la thyroïdectomie et à l'exposition au froid en mesurant le Q_{O_2} de ces tissus en présence de glucose. Il a remarqué un parallélisme frappant entre la réponse des divers tissus à l'action du froid et à celle de la thyroxine. Dans les deux cas, en effet, le Q_{O_2} du foie et du muscle augmente mais celui du cerveau ne varie pas. De plus, dans l'hypothyroïdie le Q_{O_2} du foie et du muscle diminue sans que celui du cerveau soit affecté. Barker (1955a et 1955b) a trouvé, lui aussi, que le tissu nerveux répond très mal à l'action des hormones thyroïdiennes. Weiss (1957 et 1960) a donc émis l'hypothèse que l'action des hor-

mones thyroïdiennes, qui provoque les modifications du métabolisme énergétique intervenant dans les ambiances froides, ne s'exerce que sur certains tissus comme le foie et le muscle. Il s'agit là d'une différence de sensibilité du récepteur périphérique à l'action des hormones. Ceci pourrait expliquer la différence entre nos résultats et ceux des auteurs qui ont utilisé d'autres tissus. Il faudrait bien entendu, pour étayer cette interprétation, étudier l'effet des hormones thyroïdiennes sur "l'étape succinate-fumarate" du cycle de Krebs au niveau du cerveau. Il faudrait également connaître leur effet sur le taux global de l'ATP cérébral. L'étude expérimentale de ce dernier point a été entreprise dans le laboratoire où nous travaillons. Les premiers résultats indiquent (Mandel, Harth et Ramuz, communication personnelle) que ni la thyroïdectomie, ni l'administration de thyroxine *in vivo* n'affectent le taux de l'ATP cérébral chez le Rat. Ceci vient évidemment à l'appui de notre interprétation.

f) Conclusions.

Les comparaisons des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau de divers groupes d'homéothermes font apparaître une remarquable constance de la consommation d'oxygène et de la formation d'ATP liées à "l'étape succinate-fumarate" du cycle citrique dans le tissu cérébral de ces mammifères.

Ainsi, il n'existe pas de variation interspécifique entre le Rat et le Cobaye. D'autre part, des agents pharmacodynamiques, dont l'action s'exerce au niveau du système nerveux central, comme le nembutal et plus accessoirement l'atropine n'introduisent aucune modification dans les phosphorylations oxydatives étudiées.

Cependant, notre résultat le plus important concerne l'action du froid. Nous avons montré que le froid ne provoque aucun changement de ce point du métabolisme cérébral quand on exclut les mécanismes de lutte contre le froid au cours de l'hypothermie expérimentale profonde sans anoxie, ou quand on les laisse agir chez l'animal acclimaté à une ambiance froide. Nous avons proposé une interprétation physiologique et émis une hypothèse sur le mécanisme hormonal mis en jeu à partir de l'ensemble des données bibliographiques actuelles. Nous avons indiqué un certain nombre d'expériences qui nous paraissent susceptibles de les vérifier.

2/ Comparaisons des résultats obtenus avec divers groupes d'hibernants.

Les comparaisons effectuées et leurs résultats statistiques figurent dans les tableaux XVI et XVII. Elles peuvent être groupées en deux ensembles que nous allons considérer successivement.

a) Comparaisons des résultats obtenus avec des groupes d'hibernants sacrifiés en hiver.

Nous remarquons d'abord que l'hibernation et l'hypothermie profonde qui l'accompagne ne modifient pas la consommation d'oxygène chez le Hamster. Quant à la formation d'ATP et au rapport P/O, ils semblent légèrement augmentés dans le sommeil hibernal, mais les différences observées ne sont pas statistiquement significatives. Nous n'avons cependant pas pu expérimenter sur un assez grand nombre d'animaux pour pouvoir tirer une conclusion définitive sur ce point. Nous pensons en tout cas que cette augmentation éventuelle de la production d'ATP et du rapport P/O dans l'hibernation ne peut être, si elle existe, que modérée.

Tableau XVI

Interprétation statistique des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau :

Comparaison par analyse de variance de la consommation d'oxygène et de la formation d'ATP des divers groupes d'hibernants

	Groupes comparés		Consommation d'oxygène		Formation d'ATP	
			F	p	F	p
Comparaisons des animaux d'hiver entre eux	Hamsters d'hiver réveillés	Hamsters d'hiver endormis	0,03	> 0,05	2,58	> 0,05
	Hamsters d'hiver réveillés	Spermophiles d'hiver réveillés	11,08	< 0,01	11,20	< 0,01
	Ensemble des Hamsters d'hiver	Spermophiles d'hiver réveillés	16,15	< 0,01	8,65	< 0,01
Comparaisons entre animaux d'hiver et animaux d'été	Hamsters d'été	Hamsters d'hiver réveillés	24,25	< 0,01	0,29	> 0,05
	Hamsters d'été	Hamsters d'hiver réveillés	22,41	< 0,01	5,73	< 0,05
	Hamsters d'été	Ensemble des Hamsters d'hiver	34,98	< 0,01	3,20	> 0,05

Pour toutes comparaisons figurant dans ce tableau, $dl_\varepsilon = 1$ et $dl_I = 39$

Ces résultats sont analogues à ceux qu'on obtient avec des homogénats de myocarde (Bidet 1962). Il n'y a pas, à notre connaissance, d'autres publications sur cette question. Quant aux travaux effectués sur le taux d'ATP dans le cerveau au cours de l'hibernation (Volkova 1959), ils sont très peu nombreux, comparés à ceux effectués sur d'autres organes (Zimny et Gregory 1958 et 1959). Il n'est pas possible d'en tirer d'éléments confirmant ou infirmant nos résultats.

Par ailleurs, il apparaît nettement que les homogénats de cerveau de Spermophile d'hiver consomment plus d'oxygène et produisent plus d'ATP que ceux du Hamster d'hiver. Le degré de "couplage" entre les phosphorylations et les oxydations, c'est-à-dire le rapport P/O, est, quant à lui, similaire pour ces deux groupes d'animaux. Or, le Spermophile est considéré comme un "meilleur hibernant" que le Hamster car ses phases de sommeil hibernal ininterrompu sont beaucoup plus longues (Kayser 1961). Nous reviendrons plus loin sur le rapport qui pourrait exister entre cette différence physiologique et la différence neurochimique que nous avons observée entre ces deux espèces d'hibernants.

Tableau XVII

Interprétation statistique des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau :

Comparaison par analyse de covariance des rapports P/O des divers groupes d'hibernants

	Groupes comparés		dl_I	dl_ε	F	p
Comparaisons des animaux d'hiver entre eux	Hamsters d'hiver réveillés	Hamsters d'hiver endormis	5	1	3,15	> 0,05
	Hamsters d'hiver réveillés	Spermophiles d'hiver réveillés	6	1	1,95	> 0,05
	Ensemble des Hamsters d'hiver	Spermophiles d'hiver réveillés	10	1	0,78	> 0,05
Comparaisons entre animaux d'hiver et animaux d'été	Hamsters d'été	Hamsters d'hiver réveillés	9	1	10,04	≃ 0,01
	Hamsters d'été	Hamsters d'hiver endormis	9	1	1,02	> 0,05

b) Comparaisons des résultats obtenus avec des groupes d'hibernants sacrifiés respectivement en été et en hiver.

Nous avons mis en évidence chez le Hamster une variation saisonnière de la consommation d'oxygène des homogénats de cerveau incubés en présence de succinate. En effet, cette consommation est très significativement supérieure en hiver, aussi bien avec des animaux réveillés qu'avec des animaux en sommeil, à la consommation observée en été. La différence est de l'ordre de 25 p. cent. Par contre, la quantité d'ATP formé varie peu, aussi le rapport P/O est-il nettement inférieur en hiver.

Il faut souligner que le "découplage" qui se produit en hiver n'aboutit pas à une diminution de la production absolue d'ATP par cette étape du cycle critique. En effet, l'augmentation compensatrice du phénomène d'oxydation maintient cette production au même niveau. Signalons que des variations métaboliques saisonnières ont déjà été décrites chez un Spermophile arctique par Hannon, Vaughan et Hock (1961) et chez le Hamster par Kayser (1955b et 1961). Kayser a mesuré le Q_{O_2} de coupes de cortex rénal, de myocarde et d'encéphale en présence de glucose. Pour l'encéphale, il a montré que le Q_{O_2} était plus élevé en hiver qu'en été et en automne. Remarquons que ce résultat est en plein accord avec nos observations puisque nous trouvons que la quantité d'oxygène consommée par l'une des étapes de la dégradation aérobie du glucose est plus forte en hiver qu'en été.

Des cycles saisonniers des sécrétions hormonales chez les hibernants sont sans doute à l'origine des variations du métabolisme oxydatif rencontrées chez ces animaux. On sait en effet depuis les travaux de Kayser que les

hibernants présentent en hiver un "syndrome endocrinien" caractéristique (Kayser et Aron 1938 - Kayser 1940 - 1957b - 1957c - 1961 - Kayser et Lachiver 1959 - Kayser, Petrovic et Porte 1961). Les hormones thyroïdiennes jouent peut-être un rôle important dans le déterminisme des variations saisonnières du métabolisme cérébral que nous venons de mettre en évidence, puisque c'est à l'époque de l'involution maximale de la thyroïde que nous avons observé la consommation d'oxygène la plus faible et le rapport P/O le plus élevé. Mais on comprend, après la discussion de leur effet sur les phosphorylations oxydatives cérébrales rapportée antérieurement, qu'il faudrait alors admettre une sensibilité différente du tissu nerveux à leur action chez les hibernants et chez les homéothermes. Il peut aussi s'agir d'une différence dans le taux des hormones sécrétées. Nous manquons de faits expérimentaux sur ces points qui constituent à eux seuls tout un programme de recherches.

c) Conclusions.

Les comparaisons des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau de divers groupes d'hibernants nous conduisent à trois constatations :

- En premier lieu, "l'étape succinate-fumarate" du cycle citrique et les phosphorylations qui en dépendent présentent, chez le Hamster, une variation saisonnière. En hiver, il se produit un "découplage" des phosphorylations oxydatives et une stimulation des oxydations, la production d'ATP étant ainsi maintenue au même niveau quelle que soit la saison. Nous avons admis qu'il s'agit là d'une manifestation périphérique du "syndrome endocrinien d'hiver" décrit par Kayser.

- En second lieu, le sommeil hibernal et l'hypothermie profonde qui l'accompagne ne modifient pas ce point du métabolisme cérébral.

- Enfin, c'est chez le "meilleur hibernant" que nous avons mesuré la consommation d'oxygène et la production d'ATP les plus élevées.

3/ Comparaisons entre les résultats obtenus avec les homogénats de cerveau des divers groupes d'hibernants et ceux obtenus avec les homogénats de cerveau des divers groupes d'homéothermes.

Les résultats de l'analyse statistique des comparaisons effectuées de ce point de vue figurent dans le tableau XVIII, pour les consommations d'oxygène et les quantités d'ATP formé et dans le tableau XIX pour les rapports P/O.

a) Comparaisons entre hibernants et homéothermes non traités.

Considérons d'abord les comparaisons des résultats obtenus chez les hibernants avec ceux obtenus chez les homéothermes (rats et cobayes) n'ayant subi aucun traitement particulier.

Quels que soient l'espèce et l'état physiologique, la consommation d'oxygène des homogénats de cerveau est plus élevée chez l'hibernant en hiver. De plus, c'est le "meilleur hibernant", le Spermophile, qui présente la respiration la plus intense. Par contre, en été, la consommation d'oxygène est du même ordre chez l'hibernant que chez l'homéotherme. Cette différence cyclique est entièrement due aux variations saisonnières de la consommation d'oxygène que nous avons déjà signalées chez les hibernants.

Tableau XVIII

Interprétation statistique des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau :

Comparaison par analyses de variance de la consommation d'oxygène et de la formation d'ATP des divers groupes d'hibernants et d'homéothermes

	Groupes comparés		Consommation d'oxygène		Formation d'ATP	
			F	p	F	p
Comparaisons entre hamsters d'hiver réveillés et homéothermes	Hamsters d'hiver réveillés	Rats	28,70	< 0,01	20,64	< 0,01
	Hamsters d'hiver réveillés	Cobayes	27,15	< 0,01	15,92	< 0,01
	Hamsters d'hiver réveillés	Rats ayant vécu à 7°C	17,66	< 0,01	19,25	< 0,01
	Hamsters d'hiver réveillés	Ensemble des homéothermes	35,44	< 0,01	23,26	< 0,01
Comparaisons entre spermophiles d'hiver réveillés et homéothermes	Spermophiles d'hiver réveillés	Rats	88,34	< 0,01	73,13	< 0,01
	Spermophiles d'hiver réveillés	Cobayes	82,04	< 0,01	60,57	< 0,01
	Spermophiles d'hiver réveillés	Rats ayant vécu à 7°C	66,72	< 0,01	70,32	< 0,01
	Spermophiles d'hiver réveillés	Ensemble des homéothermes	112,01	< 0,01	88,07	< 0,01
Comparaisons entre hamsters d'hiver endormis et homéothermes	Hamsters d'hiver endormis	Rats	26,75	< 0,01	39,73	< 0,01
	Hamsters d'hiver endormis	Cobayes	25,37	< 0,01	32,31	< 0,01
	Hamsters d'hiver endormis	Rats mis en hypothermie artificielle	11,83	< 0,01	21,46	< 0,01
	Hamsters d'hiver endormis	Ensemble des homéothermes	33,08	< 0,01	45,83	< 0,01
Comparaisons entre hamsters d'été et homéothermes	Hamsters d'été	Rats	0,67	> 0,05	23,22	< 0,01
	Hamsters d'été	Cobayes	0,70	> 0,05	16,94	< 0,01
	Hamsters d'été	Ensemble des homéothermes	0,97	> 0,05	28,63	< 0,01

Pour toutes comparaisons figurant dans ce tableau, $dl_\varepsilon = 1$ et $dl_I = 39$.

Tableau XIX

Interprétation statistique des résultats obtenus avec les homogénats de cerveau :

Comparaison par analyse de covariance des rapports P/O
des divers groupes d'hibernants et d'homéothermes

	Groupes comparés		dl_I	dl_ε	F	p
Comparaisons entre hamsters d'hiver réveillés et homéothermes	Hamsters d'hiver réveillés	Rats	7	1	1,85	> 0,05
	Hamsters d'hiver réveillés	Cobayes	6	1	1,98	> 0,05
	Hamsters d'hiver réveillés	Rats ayant vécu à 7°C	7	1	1,63	> 0,05
	Hamsters d'hiver réveillés	Ensemble des homéothermes	12	1	3,48	> 0,05
Comparaisons entre spermophiles d'hiver réveillés et homéothermes	Spermophiles d'hiver réveillés	Rats	8	1	3,50	> 0,05
	Spermophiles d'hiver réveillés	Cobayes	7	1	4,05	> 0,05
	Spermophiles d'hiver réveillés	Rats ayant vécu à 7°C	8	1	4,60	> 0,05
	Spermophiles d'hiver réveillés	Ensemble des homéothermes	13	1	6,61	< 0,05
Comparaisons entre hamsters d'hiver endormis et homéothermes	Hamsters d'hiver endormis	Rats	7	1	3,59	> 0,05
	Hamsters d'hiver endormis	Cobayes	6	1	3,17	> 0,05
	Hamsters d'hiver endormis	Rats mis en hypothermie artificielle	6	1	0,76	> 0,05
	Hamsters d'hiver endormis	Ensemble des homéothermes	12	1	7,61	< 0,05
Comparaisons entre hamsters d'été et homéothermes	Hamsters d'été	Rats	11	1	41,88	< 0,01
	Hamsters d'été	Cobayes	10	1	19,55	< 0,01
	Hamsters d'été	Ensemble des homéothermes	16	1	47,16	< 0,01

En ce qui concerne la formation d'ATP, quels que soient l'espèce et l'état physiologique, mais aussi quelle que soit la saison, elle demeure toujours beaucoup plus intense chez l'hibernant. Là encore, c'est le "meilleur hibernant", le Spermophile, qui présente la supériorité la plus nette sur les homéothermes.

Quant au rapport P/O, il est du même ordre chez les hibernants sacrifiés en hiver et chez les homéothermes mais celui des hibernants sacrifiés en été est très significativement supérieur à celui des homéothermes. Nous avons déjà montré qu'il existe un certain "découplage" saisonnier des phosphorylations oxydatives chez les hibernants (cf. supra) : c'est ce "découplage" qui ramène en hiver le rapport P/O au niveau de celui des homéothermes.

En résumé, malgré la variation saisonnière du rendement des phosphorylations oxydatives (rapport P/O) chez les hibernants et à cause d'une augmentation compensatrice de l'intensité des oxydations, nous constatons que la production d'ATP dans le cerveau de ces animaux reste toujours plus élevée que dans celui des homéothermes, quels que soient la saison et l'état physiologique. Nous venons ainsi de mettre en évidence dans l'encéphale, indépendamment des variations saisonnières, une différence constante entre hibernants et homéothermes.

Rappelons que jusqu'alors les recherches effectuées par Kayser et Coll. sur le tissu nerveux n'avaient pas montré d'adaptation spéciale nette de ce tissu à l'hibernation. Ainsi, le coefficient de Van't Hoff-Arrhenius pour le Q_{02} mesuré en présence de glucose (Kayser 1954 a et 1954 b) était le même. L'étude de l'action des poisons (Kayser et Lucot 1959 - Kayser 1961) n'avait pas donné non plus de résultats facilement interprétables. Enfin, la consommation d'oxygène, la consommation de glucose et la production d'acide lactique sont plus fortes dans le cortex cérébral du Hamster que dans celui du Rat mais le rapport :

$$\frac{\text{glycolyse} \times 100}{\text{consommation d'oxygène}}$$

n'est pas significativement différent (Pantesco, Lucot, Mandel et Kayser 1961). Aussi, nos résultats, qui montrent une différence tissulaire extrêmement nette entre hibernants et homéothermes, nous paraissent-ils avoir une signification physiologique importante. Il s'agit certainement là d'un des "facteurs internes" (Kayser 1940 et 1961) intervenant dans le déterminisme de l'hibernation des mammifères.

Nous proposons l'interprétation suivante de nos résultats : lors de l'hypothermie qui accompagne l'hibernation, la production d'ATP diminue, selon la loi de Van't Hoff-Arrhenius, mais, à températures centrales égales, elle restera dans l'encéphale d'hibernant supérieure à celle de l'homéotherme puisqu'au départ elle était plus élevée. Or, on sait que la production d'ATP est généralement considérée comme le support biochimique des fonctions cérébrales (Mandel et Weill 1962). Dès lors, il faut peut-être voir dans la différence que nous venons de mettre en évidence entre hibernants et homéothermes un des facteurs expliquant la résistance fonctionnelle remarquable du tissu nerveux des hibernants à l'hypothermie. Il faudrait évidemment, pour étayer cette interprétation, étudier comparativement les quantités d'ATP du cerveau des hibernants et des homéothermes ainsi que les autres réactions productrices d'ATP.

Quant au déterminisme de la différence entre hibernants et homéothermes que nous venons de constater on peut simplement dire qu'il est indépendant du "syndrome endocrinien" saisonnier puisqu'elle se manifeste aussi bien en été qu'en hiver. Il s'agit sans doute d'une "adaptation cellulaire" spécifique des hibernants. Il est d'ailleurs possible que la différence de production d'ATP concerne uniquement le système nerveux central, mais il serait nécessaire d'examiner d'aurtres tissus pour être fixé sur ce point.

b) Comparaisons entre hibernants et homéothermes en hypothermie.

La comparaison des résultats obtenus chez les Hamsters en sommeil hibernal et chez les rats en hypothermie expérimentale montre que les différences observées sont les mêmes qu'entre les hamsters d'hiver réveillés et les rats normaux. Ceci s'explique par les faits, déjà constatés, que l'hypothermie n'entraîne pas chez les homéothermes de modification de cette étape du métabolisme cérébral et que le sommeil hibernal ne semble pas non plus la modifier beaucoup.

Rappelons d'ailleurs qu'il existe des différences neuro-physiologiques considérables entre hibernants en sommeil et homéothermes en hypothermie (Kayser 1957 b).

c) Comparaison entre hibernants d'hiver réveillés et homéothermes adaptés à une ambiance froide.

L'ambiance froide de 7°C dans laquelle nous avons fait vivre un groupe de rats était identique à l'ambiance dans laquelle se trouvaient les hibernants en hiver. Certains de ces hibernants n'étant pas endormis, il était donc possible de les comparer, du point de vue métabolique étudié, aux homéothermes qui, comme eux, avaient une température centrale normale.

On observe les mêmes différences entre ces rats et les hibernants d'hiver réveillés qu'entre les rats témoins et ces mêmes hibernants. Nous avions déjà signalé, en effet, que l'acclimatation au froid ne provoquait pas, chez les homéothermes, de modification de l'étape du métabolisme énergétique cérébral examinée.

Comme nous avons attribué au "syndrome endocrinien saisonnier" les modifications hibernales observées à ce sujet chez les hibernants, nous pensons que le fait que la consommation d'oxygène, la production d'ATP soient plus élevées chez les hibernants d'hiver que chez les homéothermes acclimatés au froid, montre bien l'importance de ce syndrome endocrinien, que le froid est incapable d'induire complètement chez les homéothermes.

d) Conclusions.

Nous avons surtout mis en évidence une différence du métabolisme cérébral entre homéothermes et hibernants : malgré les variations saisonnières du rapport P/O et de la consommation d'oxygène observées chez ces derniers, la production d'ATP liée à "l'étape succinate-fumarate" du cycle de Krebs est toujours très supérieure chez les hibernants. Il nous semble qu'il s'agit là d'une "adaptation cellulaire" à l'hibernation, d'autant plus que c'est le "meilleur hibernant", le Spermophile, qui présente la production d'ATP la plus élevée.

B - RESULTATS OBTENUS AVEC DES MITOCHONDRIES DE CERVEAU ISOLEES -

Nous avons voulu voir si les résultats obtenus avec des homogénats de cerveau se retrouveraient avec des mitochondries isolées. On sait en effet, surtout à la suite des travaux de Green, que les systèmes enzymatiques impliqués dans le cycle de Krebs et dans les phosphorylations oxydatives ont une localisation mitochondriale.

Nous avons donc incubé en présence de succinate des mitochondries isolées du cerveau du Rat, du Cobaye et du Hamster d'été. Les résultats de ces expériences figurent dans le tableau XX. L'analyse statistique effectuée après vérification de l'homogénéité des variances (tableau XXI) est rapportée dans le tableau XXII pour les consommations d'oxygène et les formations d'ATP et dans le tableau XXIII pour les rapports P/O.

Tableau XX

Consommation d'oxygène, formation d'ATP et rapport P/O de mitochondries de cerveau d'homéothermes et d'hibernants incubées en présence de succinate

Animaux étudiés	Nombre animaux	Formation d'ATP µ moles/100 mg de protéines/h	Consommation d'oxygène µatomes-g/100 mg de protéines/h	P/O
Rats	7	335 ± 44	208 ± 21	1,61 ± 0,17
Cobayes	8	397 ± 67	244 ± 39	1,63 ± 0,16
Hamsters d'été	7	490 ± 82	232 ± 31	2,11 ± 0,23

Tableau XXI

Interprétation statistique des résultats obtenus avec des mitochondries de cerveau isolées :

Analyse de l'homogénéité des variances par le test de Bartlett

Résultats expérimentaux analysés	Résultats du test de Bartlett		
	χ^2	Σ dl	p
Consommation d'oxygène	2,46	19	> 0,05
Formation d'ATP	2,58	19	> 0,05

Une première constatation ressort de l'examen de ces tableaux : les rapports P/O sont, pour chaque groupe d'animaux considéré, très voisins de ceux obtenus avec les homogénats. Signalons, à ce propos, que certains auteurs avaient pensé que le rendement des phosphorylations oxydatives des mi-

tochondries isolées du cerveau du Rat diminuait avec la température d'incubation (Heald 1960). Ainsi, avec le même substrat que nous, Brody et Bain (1952) ont obtenu 1,84 à 18°C alors que Clowes et Keltch (1952) ont obtenu seulement 0,95 à 30°C. Nous pensons qu'il s'agit certainement là d'un artefact expérimental dû à l'instabilité des préparations. En effet, avec les précautions d'isolement et d'incubation que nous avons indiquées, on obtient chez le Rat des rapports P/O voisins, pour les mitochondries cérébrales, de ceux obtenus pour les mitochondries hépatiques les mieux étudiées (cf. supra).

Une seconde conclusion se dégage des données du tableau XX. En effet, les diverses comparaisons que nous avons effectuées donnent des résultats analogues à ceux des comparaisons correspondantes faites pour les homogénats. Ainsi, les consommations d'oxygène sont du même ordre pour les homéothermes et le Hamster d'été, mais la production d'ATP est plus intense chez le hamster d'été qui présente un rapport P/O plus élevé.

Tableau XXII

Interprétation statistique des résultats obtenus avec des mitochondries de cerveau isolées :

Comparaison par analyse de variance des consommations d'oxygène et des quantités d'ATP formé

Groupe comparés		Consommation d'oxygène		Formation d'ATP	
		F	p	F	p
Hamsters d'été	Rats	1,97	> 0,05	19,28	< 0,01
Hamsters d'été	Cobayes	0,54	> 0,05	7,44	< 0,05
Hamsters d'été	Ensemble des homéothermes	0,10	> 0,05	16,30	< 0,01

Pour les comparaisons figurant dans ce tableau, $dl_\varepsilon = 1$ et $dl_I = 19$

Tableau XXIII

Interprétation statistique des résultats obtenus avec des mitochondries de cerveau isolées :

Comparaison des rapports P/O par analyse de covariance

Groupes comparés		dl_I	dl_ε	F	p
Hamsters d'été	Rats	11	1	16,76	< 0,01
Hamsters d'été	Cobayes	12	1	5,36	< 0,05
Hamsters d'été	Ensemble des homéothermes	19	1	33,10	< 0,01

En somme, les expériences effectuées avec les mitochondries isolées confirment les conclusions tirées des expériences analogues faites avec les homogénats. Notons qu'il serait intéressant d'étudier ultérieurement, pour compléter ce travail, les mitochondries des animaux d'hiver et celles des homéothermes soumis au froid.

C - RESULTATS OBTENUS AVEC DES HOMOGENATS DE MYOCARDE VENTRICULAIRE -

Bidet (1962) a rapporté les résultats qu'il a obtenus avec des homogénats de myocarde ventriculaire d'hibernants et d'homéothermes incubés en présence de succinate, en employant des méthodes analogues aux nôtres. Nous avons déjà fait état de ses travaux dans la discussion de nos résultats.

Cependant, il n'a pas étudié d'animaux d'été. Or, il nous a paru intéressant de voir si le cycle saisonnier que nous avons mis en évidence au niveau de l'encéphale des hibernants se retrouve dans d'autres tissus ou s'il s'agit d'un phénomène purement neurochimique.

Nous avons donc incubé des homogénats de myocarde ventriculaire de hamsters sacrifiés en été. Les résultats figurent, avec ceux que Bidet a obtenus sur les animaux d'hiver, dans le tableau XXIV. On voit qu'il n'existe aucune différence saisonnière entre les consommations d'oxygène, ni entre les quantités d'ATP formé, ni enfin entre les rapports P/O.

Nous pouvons donc penser que le cycle saisonnier que nous avons mis en évidence est peut-être spécifiquement cérébral, mais il faudrait encore étudier d'autres tissus avant de pouvoir l'affirmer.

Tableau XXIV

Consommation d'oxygène, formation d'ATP et rapport P/O d'homogénats de myocarde ventriculaire d'hibernants incubés en présence de succinate

Animaux étudiés		Nbre anim.	Formation d'ATP µ moles/g de P.F./h	Consommation d'oxygène µatomes-g/g de P.F./h	P/O
Animaux d'hiver	Hamsters d'hiver réveillés (temp. centr. 37°C)	4	409 ± 47	519 ± 29	0,79 + 0,13
	Hamsters d'hiver endormis (temp. centr. 5 à 7°C)	4	442 ± 34	448 + 76	1,01 ± 0,19
	Spermophiles d'hiver réveillés (temp. centr. 37°C)	5	551 + 73	533 + 40	1,06 + 0,14
Animaux d'été	Hamsters d'été (temp. centr. 37°C)	4	386 + 94	504 ± 30	0,76 ± 0,11

Les données se rapportant aux animaux d'hiver contenues dans ce tableau sont empruntées à Bidet (1962). Les données concernant les hamsters d'été proviennent d'une expérimentation personnelle.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les travaux de Kayser ont montré que, chez les hibernants, le tissu nerveux, qui reste fonctionnel aux basses températures, joue un rôle essentiel dans la résistance très remarquable de ces animaux à l'hypothermie. Etant donné le rôle considérable généralement attribué à l'ATP dans l'activité nerveuse (Mandel et Weill, 1962), nous avons choisi de comparer les mécanismes métaboliques cérébraux producteurs d'ATP chez les hibernants et chez les homéothermes. Nous espérons ainsi mettre en évidence une différence neurochimique susceptible de rendre compte de la différence neurophysiologique précédente entre ces deux catégories d'animaux.

Nous nous sommes limité dans ce travail à l'étude de "l'étape succinate-fumarate" du cycle citrique et des phosphorylations oxydatives qui lui sont liées. Devant la diversité des indications bibliographiques, nous nous sommes rapidement rendu compte qu'il fallait d'abord modifier et adapter les méthodes à employer. Aussi nos recherches ont-elles été de deux ordres : recherches techniques et recherches biologiques.

A - RECHERCHES TECHNIQUES.

Nous avons comparé diverses méthodes et différentes conditions d'incubation pour la mesure du rapport P/O en présence de succinate. Notre but à été d'obtenir, aussi bien avec des mitochondries isolées qu'avec des homogénats de cerveau, des rapports P/O élevés, de l'ordre de ceux rencontrés dans la littérature récente pour d'autres organes, tout en réalisant des conditions satisfaisantes pour l'étude d'un problème de neurochimie physiologique.

Aussi avons-nous d'abord choisi, d'après les données bibliographiques, un milieu qui reste assez proche des conditions de l'environnement intracellulaire. Nous avons cependant montré que l'addition de cofacteurs, comme le cytochrome c et le FAD, n'était pas nécessaire.

Nous avons ensuite vérifié qu'il fallait tenir compte de la "respiration endogène" pour éviter de surestimer de 11 p. cent la consommation d'oxygène et de sous-estimer de 8 p. cent le rapport.

Nous devions choisir entre deux méthodes de détermination de la formation d'ATP : soit le dosage du Pi en évaluant la quantité de Pi disparu pendant l'incubation, soit le dosage du G-6-P produit à partir de l'ATP néoformé par le "système-piège" glucose-hexokinase utilisé comme inhibiteur

d'ATPase. Pour cela, nous avons démontré qu'il se produit, dans nos conditions expérimentales, une certaine dégradation du G-6-P qui interdit l'emploi de la seconde méthode. Comme cette dégradation ne s'accompagne ni d'une utilisation ni d'une libération de Pi, c'est donc la première méthode qui doit être utilisée.

Nous avons par ailleurs vérifié, à l'aide des inhibiteurs classiques comme le malonate et le DNP, que nous mesurions bien la consommation d'oxygène et la formation d'ATP liées à l'utilisation du succinate.

Enfin, nous avons démontré que l'oxalo-acétate endogène et celui qui se forme éventuellement par une dégradation du succinate postérieure au fumarate ne produisent, dans nos conditions, ni inhibition de la succino-déhydrogénase, ni réaction secondaire gênante.

B - RECHERCHES BIOLOGIQUES

Elles ont porté sur deux espèces d'homéothermes, le Rat et le Cobaye, et sur deux espèces d'hibernants, le Hamster des champs (Cricetus cricetus) et le Spermophile (Citellus citellus). Nous avons surtout étudié les homogénats de cerveau, mais nous avons également effectué un certain nombre d'expériences avec des mitochondries de cerveau isolées et, enfin, avec des homogénats de myocarde ventriculaire, étudiés à titre de comparaison. Voici les conclusions auxquelles nous sommes arrivé :

- L'oxydation du succinate et les phosphorylations oxydatives qui lui sont liées présentent une constance remarquable dans le cerveau des homéothermes. Chez le Rat, l'hypothermie expérimentale profonde et la vie dans une ambiance froide ne modifient ni la consommation d'oxygène, ni la formation d'ATP, ni le rapport P/O. Ceci montre que l'encéphale se distingue d'autres organes comme le foie et le muscle strié, qui sont sensibles à l'action des hormones thyroïdiennes dont la sécrétion est augmentée par le froid. Par ailleurs, ayant dû comparer les rats mis en hypothermie profonde à des animaux témoins en narcose, nous avons constaté que l'anesthésie au nembutal et l'injection d'atropine ne modifiaient pas non plus ce point du métabolisme cérébral.

- "L'étape succinate-fumarate" du cycle de KREBS et les phosphorylations oxydatives qui en dépendent présentent, par contre, chez un hibernant comme le Hamster des variations saisonnières. En hiver même en dehors de l'état de sommeil hibernal, on constate un "découplage" des phosrylations oxydatives et une stimulation des oxydations, mais la production d'ATP est maintenue au même niveau quelle que soit la saison. Ce cycle saisonnier n'existe pas au niveau du myocarde. Il s'agit probablement d'une manifestation périphérique du "syndrome endocrinien d'hiver" décrit par Kayser. chez les hibernants.

- Enfin, si l'on compare les deux catégories d'animaux, on constate qu'il existe entre eux, sur le plan métabolique étudié, une différence constante, indépendante du cycle saisonnier précédent et de l'état physiologique : la production d'ATP est toujours plus élevée chez les hibernants que chez les homéothermes. Il s'agit probablement là d'une "adaptation cellulaire" spécifique des hibernants. Nous pensons avoir ainsi mis en évidence une différence neurochimique susceptibles de rendre compte en partie de la résistance particulière du tissu nerveux en hypothermie.

Il serait intéressant de compléter ces recherches par l'étude, chez ces deux catégories d'animaux, des autres mécanismes métaboliques cérébraux producteurs d'ATP et par celle de la teneur et de la répartition des nucléotides libres du cerveau.

Vu
Strasbourg, le 15 octobre 1962
Le Président de Thèse
Prof. P. MANDEL

Vu
Strasbourg, le 15 octobre 1962
Le Doyen de la Faculté de Médecine,
Prof. R. FONTAINE

Vu
et Permis d'imprimer :
Strasbourg, le 20 octobre 1962
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,
J-F. ANGELLOZ

BIBLIOGRAPHIE

ABOOD, L.G., GERARD, R.W., BANK, S.J. et TSCHIRGI, R.D. (1952) - Substrate and enzym distribution in cells and cell fractions of the nervous system. *Am. J. Physiol.*, 168, p. 728-738.

ADOLPH, E.F. (1951) - Responses to hypothermia in several species of infant mammals. *Am. J. Physiol.*, 166, p. 75-91.

ALDRIDGE, W.N. (1957) - Liver and brain mitochondria. *Biochem. J.*, 67, p. 423-431.

ALDRIDGE, W.N. et PARKER, V.H. (1960) - Barbiturates and oxidative phosphorylation. *Biochem., J.*, 76, p. 47-56.

BAIN, J.A. (1952) - Enzymatic aspects of barbiturate action. *Federation Proc.*, 11, p. 653-658.

BARKER, S.B. (1955 a) - Effect of thyroïd status on succinate oxidation by various tissues of the Rat. *Endocrinology*, 57, p. 414-418.

BARKER, S.B. (1955 b) - Effect of triiodothyronine on oxygen consumption of tissues not responsive to thyroxin. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 90, p. 109-111.

BARKULIS, S.S. LEHNINGER, A.L. (1951) - Myokinase and the adenine nucléotide specificity in oxidative phosphorylations. *J. Biol. Chem.*, 190, p. 339-344.

BEISENHERZ, G., BOTTLE, H.J., BUCHERT, T., CZOK, R., GORBADE, K.H., MEYER-ARENDT, E. et PFLEIDERER, G. (1953) - Diphosphofructose-aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Deshydrogenase, Milchsaüre - Deshydrogenase, Glycero-phosphat-Deshydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einim Arbeitsgang. *Z. NaturForsch.*, 8 b, p. 555-577.

BELL, R.D. et DOISY, E.A. (1920) - Rapid colorimetric methods for the determination of phosphorus in urine and blood. *J. Biol. Chem.* 44, p. 55-67.

BERENBLUM, I. et CHAIN, E. (1938) - An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, 32, p. 295-298.

BERGER, L., SLEIN, M.W., COLOWICK, S.P. et CORI, C.F. (1946) - Isolation of hexokinase from Backer's yeast. *J. Gen. Physiol.*, 29, p. 379 -391.

BERNARD, Claude (1876) - *Leçons sur la chaleur animale*, 471 pp., Paris, Baillière.

BEYER, R. E. (1960) - Comments on oxidative phosphorylation in relation to cold acclimatation. *Federation Proc.*, 19, (sup. 5), p. 145.

BIDET, R. (1962) - Contribution à l'étude de l'électrocardiogramme intracellulaire et des phosphorylations oxydatives d'homéothermes et d'hibernants. *Thèse de Doctorat en Médecine*, Strasbourg, 66 pp. dactylographiés

BOFFI, L., FAZZINI, G. et MASSIMO, C. (1958) - Deep hypothermia : succinic dehydrogenase activity in the myocardium of the Rat (original en italien). *Sperimentale*, 108, p. 419-427.

BOFFI, L. et MASSIMO, C. (1958) - Succinic dehydrogenase in the heart of the Rat in hypothermia (original en italien). *Sperimentale*, 108, p. 81-89.

BONNER, W. D. (1955) - Succinic dehydrogenase, in COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O., *Methods in Enzymology*, Vol. I, 835 pp., New York et Londres, Academic Press Inc.

BRIGGS, A. P. (1922) - A modification of the BELL-DOISY Phosphate method. *J. Biol. Chem.*, 53, p. 13-16.

BRODY, T. M. (1955) - The uncoupling of oxidative phosphorylation as a mechanism of drug action. *Pharmacol. Rev.*, 7, p. 335-363.

BRODY, T. M. et BAIN, J. A. (1951) - Effect of barbiturates on oxydative phosphorylation. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 77, p. 50-53.

BRODY, T. M. et BAIN, J. A. (1952) - A mitochondrial préparation from mammalian brain. *J. Biol. Chem.*, 195, p. 685-696.

BRODY, T. M., BAIN, J. A. et HURWITZ, R. (1954) - Barbiturates and oxidative phosphorylation. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 110, p. 148-156.

BRONK. J. R. (1960) - The influence of thyroxine and related compounds on oxidative rate and efficiency of phosphorylation in liver mitochondria particles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 86, p. 494-505.

BUCHER, T. (1955) - Enclase from Brewer's yeast in COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O., *Methods in Enzymology*, Vol. I, 835 pp., New York et Londres, Academic Press Inc.

CALDWELL, P. C. (1954) - An investigation on the intracellular pH of Crab muscle fibres by means of micro-glass and micro-tungsten-électrodes. *J. Physiol.*, 126, p. 169-180.

CHANCE, B. et HAGIHARA, B. (1960) - Initiation of succinate oxidation in aged Pigeon heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Communs.*, 3, p. 1-5.

CHANCE, B. et WILLIAMS, G. R. (1955) - A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*, 175, p. 1120-1121.

CHANCE, B. et WILLIAMS, G. R. (1956) - The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. in Enzymol.*, 17, p. 65-134.

CHATFIELD, P. O. et LYMAN, C. P. (1954) - Subcortical electrical activity in the Golden Hamster during arousal and hibernation. *Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.*, 6, p. 403-408.

CHATFIELD, P. O., LYMAN, C. P. et PURPURA, D. P. (1951) - The effect of temperature on spontaneous and induced electrical activity in the

cerebral cortex of the Golden Hamster. *Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.*, 3, p. 225-230.

CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. et WARNER, H. (1956) - Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 28, p. 1756-1758.

CLELAND, K.W. et SLATER, E.C. (1953) - Respiratory granules of heart-muscle. *Biochem. J.*, 53, p. 547-556.

CLIFTON, C.E. (1946) - Microbial assimililations. *Adv. in Enzymol.*, 6, p. 269-305.

CLOWES, G.H.A. et KELTCH, A.K. (1952) - Action of fluoride and other reagents on phosphorylation in malignant and certain normal tissues. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 81, p. 356-362.

COPENHAVER, J.H. Jr. et LARDY, H.A. (1952) - Oxidative phosphorylation: pathways and yield in mitochondrial preparations. *J. Biol. Chem.*, 195, p. 225-238.

COTTLE, M. et CARLSON, L.D. (1956) - Turnover of thyroïd hormone in cold-exposed rats determined by radioactive iodine studies. *Endocrinology*, 59, p. 1-11.

DALLAM, R. et HOWARD, R.B. (1960) - Thyroxine-enhanded oxidative phosphorylation of Rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys., Acta*, 37, p. 188-189.

DALLAM, R.D. et REED, J.M. (1960) - Effect of thyroxine on mitochondrial oxidation and swelling. *J. Biol. Chem.*, 235, p. 1183-1186.

DAS, L.B. (1937) - Studies on the inhibition of succinic, lactic and malic-dehydrogenase. *Biochem. J.*, 31, p. 1124-1130.

DEMPSEY, E.W. et ASTWOOD, E.B. (1943) - Determination of the rate of thyroïd hormone secretion at various environmental températures. *Endocrinology*, 32, p. 509-518.

EDWARDS, A.L. (1950) - *Expérimental design in psychology research.* 445 pp. New York, Rinehart.

EDWARDS, W.F. (1824) - *De l'influence des agents physiques sur la vie.* 655 pp., Paris, Crochard.

ERNSTER, L. (en publication) - The phosphorylation occuring in the flavoprotein region of the respiratory chain. In Symposium intracellular Respiration : Phosphorylating and non-phosphorylating reactions, *5th Intern. Congr. Biochem.*, Londres, Pergamon Press.

FLETCHER, K., MYANT, N.B. et TYLER, D.D. (1962) - The influence of thyroïd hormone upon the metabolism of adenosine triphosphate in Rat liver. *J. Physiol.*, 162, p. 345-357.

FUHRMAN, G.J. et FUHRMAN, F.A. (1959) - Oxygen consumption of animals and tissues as a function of temperature. *J. Gen. Physiol.*, 42, p. 715-722.

GELINEO, S. (1934) - Influence du milieu thermique d'adaptation sur la thermogenèse des homéothermes. *Ann. Physiol: Physicochim. Biol.*, 10, p. 1083-1115.

GOODWIN, T. W. (1960) - *Recent advances in Biochemistry*, 4 th ed., 301 pp., Londres, J. et A. Churchill Ltd.

GORNAL, A. G., BARDAWILL, C. J. et DAVID, M. (1949) - Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, p. 751-766.

GREEN, D. E. et BEINERT, H. (1955) - Biological oxidations. *Ann. Rev. Biochem.*, 24, p. 1-44.

GREEN, D. E. et FLEISCHER, S. (1960) - Mitochondrial system of enzymes in GREENBERG, D. M., *Metabolic pathways*, 2nd ed., Vol. I, 572 pp., New York et Londres, Academic Press Inc.

GREENGARD, P., MINNAERT, K., SLATER, E. C. et BETEL, I. (1959) - Yield of oxidative phosphorylation associated with the oxidation of succinate to fumarate. *Biochem. J.*, 73, p. 637-646.

HAGIHARA, B. et LARDY, H. A. (1960) - A method for the separation of orthophosphate from other phosphate compounds. *J. Biol. Chem.*, 235, p. 889-894.

HANNON, J. P. (1959) - Effect of prolonged cold-exposure on oxidative phosphorylation and adenosinetriphosphatase activity of Rat liver tissue. *Am. J. Physiol.*, 196, p. 890-892.

HANNON, J. P. (1960) - Tissue energy metabolism in the cold acclimatized Rat. *Federation Proc.*, 19 (sup. 5), p. 139-144.

HANNON, J. P., VAUGHAN, D. et HOCK, R. J. (1961) - The endogenous tissues respiration of the arctic ground Squirrel as affected by hibernation and season. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 57, p. 5-10.

HEALD, P. J. (1960) - *Phosphorus metabolism of brain*. 195, pp., Oxford, Pergamon Press.

HOCH, F. L. et LIPMANN, F. (1954) - The uncoupling of respiration and phosphorylation by thyroïd hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 40, p 909-921.

HOGEBOOM, G. H., SCHNEIDER, W. C. et PALLADE. G. (1948) - Cytochemical studies of mammalian tissues. I - Isolation of intact mitochondria from Rat liver ; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem.*, 172, p. 619-635.

HOIJER, D. J. (1960) - Metabolic function of ascorbic acid in acclimatation to cold. *Federation Proc.*, 19 (Sup. 5), p. 90-93.

HORECKER, B. L. et KORNBERG, A. (1948) - The extinction coefficients of reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 175, p. 385-390.

HORVATH, A. (1876) - Zur Abkühlung der Warmblüter. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 12, p. 278-282.

HUNTER, F. E. Jr. (1955) - Coupling of phosphorylation with oxidation, in COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O., *Methods in Enzymology*, Vol. 2, 987 pp., New York et Londres, Academic Press.

JACOBS, E. E. et CRANE, F. L. (1960) - Uncoupling and inhibition of succinate oxidation by short chain derivatives of coenzyme Q. *Biochem. Biophys. Res. Communs.*, 3, p. 333-336.

JACOBS, E. E. et SANADI, D. R. (1960) - Phosphorylation coupled to electron transport médiated by high potential electron carriers. *Biochim. Biophys. Acta.*, 38, p. 12-33.

JOWET, M. et QUASTEL, J. H. (1937) - The effects of narcotics on tissues oxidations. *Biochem. J.*, 31, p. 565-578.

KALCKAR, H. M. (1937) - cité d'après MYRBACK, K., Nonproteolytic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 8, p. 59-80.

KAPLAN, N. O., SWARTZ, M. N., FRECH, M. E. et CIOTTI, M. (1956). Phosphorylative and non phosphorylative pathways of electron transfer in Rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 42, p. 481-488.

KAYSER, Ch. (1937) - Variations du quotient respiratoire en fonction de la température du milieu chez le Rat, le Pigeon et le Cobaye. *C.R. Soc. Biol.*, 126, p. 1219-1221.

KAYSER, Ch. (1940) - Essai d'analyse du mécanisme du sommeil hibernal. *Ann. Physiol.*, 16, p. 314-372.

KAYSER, Ch. (1954 a) - L'incrément thermique critique de la respiration in vitro du tissu rénal de Rat blanc et de Hamster (Cricetus cricetus). *C.R. Acad. Sci.*, 239, p. 514-515.

KAYSER, Ch. (1954 b) - L'incrément thermique critique de la respiration in vitro de tissu rénal de Hamster ordinaire (Cricetus cricetus) réveillé en été et en sommeil en hiver. *C.R. Acad. Sci.*, 239, p. 554-556.

KAYSER, Ch. (1955 a) - Hibernation vraie, hibernation artificielle et hypothermie expérimentale. *Acta Anesthésiol.*, 3, p. 103-121.

KAYSER, Ch. (1955 b) - Hibernation et hypothermie des mammifères. *Acta Neurovegetativa*, 11, p. 38-39.

KAYSER, Ch. (1957 b) - Effet de la température sur la durée de différents accidents de l'électrocardiogramme chez quelques mammifères homéothermes et deux hibernants refroidis. *Arch. Sci. Physiol.*, 11, p. 7-27.

KAYSER, Ch. (1957 b) - Physiological aspects of hypothermia. *Ann. Rev. Physiol.*, 19, p. 83-120.

KAYSER, Ch. (1957 c) - Le sommeil hibernal, problème de thermorégulation. *Rev. Canad. Biol.*, 16, p. 303-389.

KAYSER, Ch. (1958) - Résistance à l'hypothermie profonde chez les mammifères hibernants et homéothermes. *C.R. Soc. Biol.*, 152, p. 1198-1201

KAYSER, Ch. (1961) - Intervention de facteurs externes et internes dans le déterminisme de l'hibernation des mammifères. *Arch. Sci. Physiol.*, 15, p. 377-420.

KAYSER, Ch. et ARON, M. (1938) - Cycle d'activité saisonnière des glandes endocrines chez un hibernant, le Hamster (Cricetus frumentarius). *C.R. Soc. Biol.*, 129, p. 225-226.

KAYSER, Ch. et HIEBEL, G. (1952) - L'hibernation naturelle et artificielle des hibernants et l'hypothermie généralisée expérimentale du Rat et de quelques hibernants. *Pr. Med.*, 60, p. 1699-1702.

KAYSER, Ch. et LACHIVER, P. (1959) - Le rôle du séjour à basse température, du jeûne et de l'alimentation sur le déterminisme du sommeil

hivernal et de l'hypothermie profonde chez le Lérot. *Arch. Sci. Physiol.*, 13, p. 469-482.

KAYSER, Ch. et Lucot, M. A. (1959) - Effet du malonate et du dinitrophénol sur la respiration de coupes d'encéphale de Rat blanc en croissance et de Hamster adulte. *C.R. Soc. Biol.*, 153, p. 459-462.

KAYSER, Ch. PETROVIC, A. et PORTE, A. (1961) - Variations ultrastructurales de la parathyroïde du Hamster ordinaire (Cricetus cricetus) au cours du cycle saisonnier. *C.R. Soc. Biol.*, 155, p. 2178-2184.

KAYSER, Ch. et RICHERT, R. (1958) - Le mécanisme de la mort en hypothermie. *C.R. Acad. Sci.*, 246, p. 2799-2801.

KAYSER, Ch., ROHMER, F. et HIEBEL, G. (1951) - L'E. E. G. de l'hibernant. Léthargie et réveil spontané du Spermophile. Essai de reproduction de l'E. E. G. chez le Spermophile réveillé et le Rat blanc. *Rev. Neurol.*, 84 ; p. 570-578.

KIELLEY, W. W. et BRONK, J. R. (1957) - Oxidative phosphorylation in sonic extracts of rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 23, p. 448-449.

KIELLEY, W. W. et KIELLEY, R. K. (1951) - Myokinase and adenosinetriphosphatase in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 191, p. 485-500.

KIELLEY, W. W. et KIELLEY, R. K. (1953) - A specific adenosinetriphosphatase of liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 200, p. 213-222.

KLINGENBERG, M. et SCHOLLMEYER, P. (1961) - On the relation between the activation of succinate oxidation and the activation of DPN reduction in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Communs.*, 4, p. 38-42.

KREBS, H. A., JOHNSON, M., EGGLESTON, L. V. et HEMS, R. (1951 a) - The reactivity of the labile phosphate groups of adenosinetriphosphate. *Biochem. J.*, 49, XXXV-XXXVI.

KREBS, H. A., EGGLESTON, L. V. et TERNER, C. (1951 b) - In vitro measurements of the turnover rate of potassium in brain and retina. *Biochem. J.*, 48, p. 530-537.

KREBS, H. A., RUFFO, A., JOHNSON, M., EGGLESTON, L. V. et HEMS, S. R. (1953) - Oxidative phosphorylation. *Biochem. J.*, 54, p. 107-116.

KUFF, E. L. et SCHNEIDER, W. C. (1954) - Intracellular distribution of enzymes. XII - Biochemical heterogeneity of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 206, p. 677-685.

KUHN, E., SCHREIER, K., WOMER, W., SPOHN, K., KOLB, E., HEINZEL, J. et KROTZERT, R. (1959) - Metabolism in deep hypothermia under 20 degrees and long-lasting artificial circulation arrest (original en allemand). *Klin. Wochenschr.*, 37, p. 651-654.

LARDY, H. A. et WELLMAN, H. (1952) - Oxidative phosphorylation : role of inogarnic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J. Biol. Chem.*, 195, p. 215-225.

LEBLOND, C. P. et GROSS, J. (1943) - Effect of thyroïdectomy on resistance to low environmental temperature. *Endocrinology*, 33, p. 156-160.

LEHNINGER, A. L. (1960) - Oxidative phosphorylation in submitochondrial systems. *Federation Proc.*, 19, p. 952-962.

LEHNINGER, A. L., MANSOOR UL HASSAN et SUDDUTH, H. C. (1954) - Phosphorylation coupled to the oxidation of ascorbic acid by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 210, p. 911-922.

LEHNINGER, A. L., et WADKINS, C. L. (1962) - Oxidative phosphorylation *Ann. Rev. Biochem.*, 31, p. 47-73.

LEPAGE, G. A. (1946) - Biological energy transformations during shock as shown by tissue analyses. *Am. J. Physiol.*, 146, p. 267-281.

LINDBERG, O., LJUNGGREN, M., ERNSTER, L. et REVESZ, L. (1953) - Isolation and some enzymic properties of Ehrlich ascites tumor mitochondria. *Exper. Cell. Res.*, 4, p. 243-245.

LISON, L. (1956) - *Statistique appliquée à la biologie expérimentale.* 346 pp., Paris, Gauthier-Villars.

LOOMIS, W. F. et LIPMANN, F. (1948) - Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. *J. Biol. Chem.*, 173, p. 807-808.

LOWY, R. (1957) - Effects de la cortisone sur les phosphorylations oxydatives. *Thèse de Doctorat ès-Sciences,* Paris, 126 pp. dactylographiées.

LYMAN, C. P. et CHATFIELD, P. O. (1950) - Effect of temperature on spontaneous and induced electrical activity in cerebral cortex of Golden Hamster. *Am. J. Physiol.*, 163, p. 731.

MACHEBOEUF, M. et DELSAL, J. L. (1943) - Sur le dosage de très petites quantités de phosphore dans des matières organiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 25, p. 116-122.

MALEY, G. F. et LARDY, H. A. (1953) - Metabolic effects of thyroïd hormones in vitro. II - Influence of thyroxine and triiodothyronine on oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 204, p. 435-444.

MALEY, G. F. et LARDY, H. A. (1955) - Efficiency of phosphorylation in selected oxidations by mitochondria from normal and thyrotoxic Rat liver. *J. Biol. Chem.*, 215, p. 377-388.

MANDEL, P. (1959) - Meuble réfrigéré pour manipulations à basses températures. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41, p. 173-174.

MANDEL, P. et HARTH, S. (1960) - Nucléotides du cerveau de quelques espèces de mammifères. *J. Physiol.*, (Paris), 52, p. 166-167.

MANDEL, P. et HARTH, S. (1961) - Free nucleotides of the brain in various mammals. *J. Neurochem.*, 8, p. 116-125.

MANDEL, P., HARTH, S. et RAMUZ, M. (Communication personnelle) - Effet de la thyroïdectomie et de l'injection de thyroxine sur les nucléotides libres du cerveau.

MANDEL, P. et WEILL. J. D. (1962) - Nucleotides du système nerveux central. *J. Physiol.* (Paris), 54, p. 199-267.

MARTIN, J. B. et DOTY, D. M. (1949) - Determination of inorganic phosphate-Modification of isobutyl alcohol procedure. *Anal. Chem.*, 21, p. 965-967.

MARTIUS, C. et HESS, B. (1951) - The mode of action of thyroxin. *Arch.*

Biochem. Biophys., 33, p. 486-487.

MINARD, F.N. et DAVIS, R.V. (1962) - Effect of chlorpromazine ether and phenobarbital on the active-phosphate level of Rat brain : an improved extraction technique for acid-soluble phosphates. *Nature*, 193, p. 277 -278.

MORRISON, M. (1961) - Biological oxidations. *Ann. Rev. Biochem.*, 30, p. 11 -44.

MORRISON, M., HOLOCHER, T. et STOTZ, E. (1961) - An evaluation of cytochrome c preparations in oxidation and phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 92, p. 338-342.

NECHAEVA, G.E. (1961) - The effect of deep hypothermia on the carbohydrate-phosphorus metabolism of cerebral tissue (original en russe). *Chemical Abstracts*, 55, 3761a.

NIELSEN, S.O. et LEHNINGER, A.L. (1955) - Phosphorylation coupled to the oxidation of ferrocytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 215, p. 555-570.

OCHOA, S. (1943) - Efficiency of aerobic phosphorylation in cell-free heart extracts. *J. Biol. Chem.*, 151, p. 493-505.

PACKER, L. (1957) - Coupled phosphorylation in Rat-heart-muscle sarcosomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 70, p. 290-293.

PAGE, E. et CHENIER, L.P. (1953) - Effects of diets and cold environment on the respiratory quotient of the white Rat. *Rev. Canad. Biol.*, 12, p. 530-541.

PANAGOS, S., BEYER, R.E. et MASORO, E.J. (1958) - Oxidative phosphorylation in liver mitochondria prepared from cold-exposed rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 29, p. 204-205.

PANTESCO, V., LUCOT, M.A., MANDEL, P. et KAYSER, Ch. (1961) - Glycolyse et consommation d'oxygène de coupes de différents tissus de Rat blanc et de Hamster ordinaire. *C.R. Soc. Biol.*, 155, p. 1709-1711.

PARDEE, A.B. et POTTER, V.R. (1948) - Inhibition of succinic dehydrogenase by oxaloacetate. *J. Biol. Chem.*, 176, p. 1085-1094.

PARKER, V.H. (1958) - Effect of nitrophenols and halogenophenols on the enzymatic activity of Rat-Liver mitochondria. *Biochem. J.*, 69, p. 306 -311.

POTTER, V.R. (1957) - The homogenate technique in UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. and STAUFFER, J.F., *Manometric techniques*, 3rd ed. 338 pp., Minneapolis, Burgess Publiscing Co.

POTTER, V.R. (1958) - Possible biochemical mechanisms inderlying adaptation to cold. *Federation Proc.*, 17, p. 1060-1063.

POTTER, V.R., PARDEE, A.B. et LYLE, G.G. (1948) - The assay of animal tissues for respiratory enzymes. VIII - Conditions for exaloacetate oxidation in whole homogenates. *J. Biol. Chem.*, 176, p. 1075-1084.

QUASTEL, J.H. (1955) - Biochemical aspect of narcosis, in ELLIOT, K. A.C., PAGE, I.H. and QUASTEL, J.H., *Neurochemistry*, 900 pp., Springfield (Illinois, USA), Ch.C. Thomas Publiscer.

QUASTEL, J. H. and WHEATLY, A. H. M. (1931) - Biological oxidations in the succinic acid series. *Biochem. J.*, 25, p. 117-128.

QUASTEL, J. H. et WOOLDRIDGE, W. R. (1928) - Some properties of the dehydrogenating enzymes of bacteria. *Biochem J.*, 22, p. 689-702.

RACKER, E. (1961) - Mechanism of synthesis of adenosinetriphosphate. *Adv. in Enzymol.*, 23, p. 323-399.

RICHARDS, A. G., SIMONSON, E. et WISSCHER, M. B. (1953) - Electrocardiogram and phonogram of adult and newborn Mice in normal conditions and under the effect of cooling, hypoxia and potassium. *Am. J. Physiol.*, 174, p. 297-298.

RILEY, V., HOBBY, G., et BURK, D. (1953) - Oxidizing enzymes of Mouse melanomas ; their inhibition enhencement and chromatographic separation. *Pigment Cell Growth* (Proc. 3rd Conf. Biol. Normal and Atyp. Pigment Cell Growth), p. 231-266.

SAMSON, F. E., BALFOUR, W. Jr. et DALIL, N. A. (1959) - Cerebral free energy and viability : adenosinetriphosphate in rats under nitrogen and iodoacetate with the effects of temperature. *Am. J. Physiol.*, 196, p. 325-326.

SAVCHENKO, O. N. (1958) - Carbohydrate and phosphate metabolism of the brain during hypothermia and hypoxia (original en russe). *Chemical abstracts*, 52, 15699 a.

SCHOLLMEYER, P. et KLINGENBERG, M. (1961) - Oxaloacetate and adenosinetriphosphate levels during inhibition and activation of succinate oxidation. *Biochem. Biophys. Res. Communs.*, 4, p. 43-47.

SELLERS, E. A., REICHMAN, S., THOMAS, N. et YOU, S. S. (1951) - Acclimatization to cold in rats : metabolic rates. *Am. J. Physiol.*, 167, p. 651-655.

SELLERS, E. A. et YOU, S. S. (1950) - Role of thyroïd in metabolic responses to a cold environment. *Am. J. Physiol.*, 163, p. 81-91.

SHTUTMAN, T. M. (1959) - Content of adenosinetriphosphate, creatine phosphate and lactic acid in the brain and muscles of rabbits in hypothermia (original en russe). *Chemical Abstracts*, 53, 10436c.

SIEKEVITZ, P. et POTTER, V. R. (1953) - The adenylatekinase of Rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 200, p. 187-196.

SINGER, T. P. et KEARNEY, E. B. (1955) - Intermediary metabolism of L-cysteinesulfinic acid in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 61, p. 397-409.

SKULACHEV, V. P. et MASLOV, S. P. (1961) - Role of nonphosphorylating oxidation in thermoregulation (original en russe). *Chemical Abstracts*, 55, 12586 e.

SKULACHEV, V. P. (en publication) - Regulation of the coupling of oxidation and phosphorylation, in Symposium Intracellular Respiration : Phosphorylating and non phosphorylating reactions, *5 th Intern. Congr. Biochem.*, Londres, Pergamon Press.

SLATER, E. C. (1953) - A method of measuring the yield of oxidative phosphophosphorylation. *Biochem. J.*, 53, p. 521-530.

SLATER, E. C. (en publication) - Mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation by nitrophenols, in symposium Intracellular Respiration : Phosphorylating and nonphosphorylating reactions, *5th Intern. Congr. Biochem.* Londres, Pergamon Press.

SLATER, E. C. et CLELAND, K. W. (1952) - Stabilisation of oxidation phosphorylation in heart-muscle sarcosomes. *Nature*, 170, p. 118-119.

SLATER, E. C. et CLELAND, K. W. (1953) - The effect of tonicity of the medium on the respiration and phosphorylative activity of heart muscle sarcosomes. *Biochem J.*, 53, p. 557-567.

SLATER, E. C. et HOLTON, F. A. (1954) - Oxidative phosphorylation coupled with the oxidation of α-Ketoglutarate by heart muscle sarcosomes. *Biochem. J.*, 56, p. 28-40.

SMITH, R. E. (1960) - Mitochondrial control of oxidative phosphorylation in cold-acclimated rats. *Federation Proc.*, 19, (Sup. 5), p. 146-151.

SMITH, R. E. et HOIJER, D. J. (1962) - Metabolism and cellular function in cold acclimatation. *Physiol. Rev.*, 42, p. 60-142.

SOSKIN, S. et THAUBENHAUS, M. (1943) - Sodium succinate as an antidote for barbiturate poisonning in the control of the duration of barbiturate anesthesia. *J. Pharmacol.*, 78, p. 49-55.

STANBURY, S. W. et MUDGE, G. H. (1954) - Polyphasic response of respiration and aerobic phosphorylation to 2,4-dinitrophenol. *J. Biol. Chem.*, 210, p. 949-964.

STEWART, C. A. (1953) - Calculation of reaction rates in steady systems. *Biochem. J.*, 54, p. 117-118.

SWINGLE, K. F., AXELROD, A. E. et ELVEHJEM, C. A. (1942) - the mechanism of the effect of calcium salts on the succinoxidase system. *J. Biol. Chem.*, 222, p. 581-591.

TAPLEY, D. F. et COOPER, C. (1956) - The effect of thyroxine and related compound on oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 222, p. 341-349.

THOMPSON, J. F. et MIDUTA, E. T. (1954) - Enzymatic activity of cytoplasmic particulates of Rat liver isolated by gradient centrifugation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 51, p. 487-498.

THORN, M. B. (1953) - Inhibition by malonate of succinic dehydrogenase in heart muscle preparation. *Biochem. J.*, 54, p. 540-547.

TYLER, D. B. (1955) - Effect of metal ions and adenosinetriphosphate on an oxalacetate-inhibited succinoxidase activity. *J. Biol. Chem.*, 216, p. 395-403.

UMBREIT, W. W., BURRIS, R. M. et STAUFFERT, J. F. (1957) - *Manometric Techniques*, 2nd ed. 338 pp., Minneapolis, Burgess Publiscing Co.

VLADIMIROV, G. E. (1959) - Effect of hypothermia and blood circulation arrest on brain metabolism (original en russe). *Chemical Abstracts*, 53, 1502d.

VLADIMIROV, G. E. et RUEBEL, L. N. (1957) - The turnover of hexosemonophosphate in the brain and the effect of stimulation, narcosis and hypothermia, in RITCHER, D., *Metabolism of the nervous system*, 599, pp. Londres, Pergamon Press.

VOLKOVA, R.I. (1959) - The metabolism of labile phosphorus compounds in the brain of Turtle during normal state and hibernation (original en russe). *Chemical Abstracts*, 53, 1572d.

VYSOTSKAYA, N.B. (1959) - Influence of cooling on the content of phosphorus fractions in the superior cervical ganglion (original en russe). *Chemical Abstracts*, 53, 9406 a.

WALTHER, A. (1865) - Studien im Gebiete der Thermophysiologie. *Reichert und Du Bois-Reymond Arch. Anat. Physiol.*, p. 25-51.

WEILL, J.D. (1958) - Recherches sur la constitution et le métabolisme des acides ribonucléiques du foie et du pancréas de Rat. *Thèse de Doctorat ès-Sciences*, Strasbourg, 176 pp. dactylographiées.

WEIL-MALHERBE, H. (1955) - Oxidation mechanisms, in ELLIOT, K.A.C., PAGE, I.H. and QUASTEL, J.H., *Neurochemistry*, 900 pp., Spring-field (Illinois, USA), Ch. C. Thomas Publisher.

WEINBACH, E.C. (1959) - Stability of oxidative phosphorylation and related reactions in isolated liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 234, p. 1580-1586.

WEISS, A.K. (1957) - Tissue responses in the cold exposed Rat. *Am. J. Physiol.*, 188, p. 430-438.

WEISS, A.K. (1960) - Factors which effect cold acclimatisation. *Federation Proc.*, 19, (Sup. 5), p. 137-138.

WOODS, R. et CARLSON, L.D. (1956) - Thyroxin secretion in rats exposed to cold. *Endocrinology*, 59, p. 323-330.

YANG, W.C. (1960) - The stimulatory effect of EDTA on cardiac mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Res. Communs.*, 2, p. 22-25.

ZIMMY, M.L. et GREGORY, R. (1958) - High-energy phosphates during hibernation and arousal in the ground Squirrel. *Am. J. Physiol.*, 195, p. 233-236.

ZIMMY, M.L. et GREGORY, R. (1959) - High-energy phosphates during long-term hibernation. *Science*, 129, p. 1363-1364.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

ABREVIATIONS 9

AVANT-PROPOS 10

INTRODUCTION 12

PREMIERE PARTIE : METHODES ET TECHNIQUES 15

A - Choix des animaux 16

1) Mammifères hibernants 16
2) Mammifères homéothermes 16

B - Méthode utilisée pour réaliser l'hypothermie artificielle du Rat 17

C - Préparation des homogénats 18

1) Homogénats de cerveau 18
2) Homogénats de myocarde 20

D - Preparation des mitochondries par fractionnement cellulaire 20

E - Techniques analytiques 21

1) Mesure de la consommation d'oxygène 21
2) Dosage du phosphore 21
3) Dosage du glucose-6-phosphate 23
4) Dosage des protéines 23

F - Mode d'expression des résultats 24

G - Analyse statistique des résultats 24

1) Analyse de variance 24
2) Analyse de covariance 25
3) Test de Bartlett 25

DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES PERSONNELLES 27

Chapitre I - EXPOSE ET JUSTIFICATION DE LA METHODE ET DES CONDITIONS EMPLOYEES POUR LA MESURE DU RAPPORT P/O..... 28

Pages

A - Choix du milieu et des conditions d'incubation 28

B - Choix du procédé expérimental général 32

1) Description de la marche d'une expérience 32
2) Résultats expérimentaux 33
3) Discussion 33

C - Choix de la méthode d'évaluation de la formation D'ATP.. 34

1) Position du problème 34
2) Résultats expérimentaux 35
3) Discussion 35

D - Expérience d'inhibition spécifique 39

1) Inhibition de la succino-dehydrogenase par le malonate.. 40
2) Découplage des phosphorylations oxydatives par le dinitrophénol..... 40

E - Discussion du problème de l'inhibition possible de la succino-dehydrogenase par l'oxaloacetate 41

Chapitre II - RESULTATS EXPERIMENTAUX OBTENUS AVEC DIVERS GROUPES D'HOMEOTHERMES ET D'HIBERNANTS ET DISCUSSION DE CES RESULTATS 44

A - Résultats obtenus avec les homogénats du cerveau 44

1) Comparaisons des résultats obtenus chez les homéothermes dans diverses circonstances expérimentales .. 45

a) Ecart entre la valeur théorique et la valeur mesurée du rapport 46
b) Absence de variations interspécifiques des phosphorylations oxydatives cérébrales 48
c) Absence de modifications des phosphorylations oxydatives cérébrales dans la narcose aux barbituriques 48
d) Absence de modification des phosphorylations oxycérébrales dans l'hypothermie expérimentale..... 49
e) Absence de modification des phosphorylations oxydatives cérébrales chez les homéothermes acclimatés à une ambiance froide 51
f) Conclusions 54

2) Comparaisons des résultats obtenus avec divers groupes d'hibernants 54

a) Comparaisons des résultats obtenus avec des groupes d'hibernants sacrifiés en hiver 54
b) Comparaisons des résultats obtenus avec des groupes d'hibernants sacrifiés respectivement en été et en hiver 56
c) Conclusions 57

3) Comparaisons entre les résultats obtenus avec les homogénats de cerveau des divers groupes d'hibernants et ceux obtenus avec des homogénats de cerveau des divers groupes d'homéothermes..... 57

Pages

a) Comparaisons entre hibernants et homéothermes non traités. 57
b) Comparaisons entre hibernants et homéothermes en hypothermie. 61
c) Comparaisons entre hibernants d'hiver réveillés et homéothermes adaptés à une ambiance froide. . . 61
d) Conclusions. 61

B - Résultats obtenus avec des mitochondries de cerveau isolées 62

C - Résultats obtenus avec des homogénats de myocarde ventriculaire 64

RESUME ET CONCLUSIONS 66

BIBLIOGRAPHIE 70

IMP. LOUIS-JEAN — GAP
Dépôt légal n° 274 — 1964